LABORATOIRE VAILLANT-DEFRESNE
65-77, RUE FALGUIÈRE
75739 PARIS CEDEX 15

/

SUSPENSIONS INTÉGRALES DE PLANTES FRAICHES

DOSSIER BIBLIOGRAPHIQUE

L'AUBEPINE

CRATAEGUS OXYACANTHA T
CRATAEGUS MONOGYNA J

PLAN

V Terpenoïdes de l'Aubepine

A) Mise en evidence chromatographique

B) Sesquiterpènes

C) Triterpènes pentacycliques

1. Extraction des triterpènes pentacycliques

2. Triterpènes pentacycliques identifies

VI Essais :

Perte à la dessiccation
Cendres totales
Cendres sulfuriques
Essai chromatographique

CHAPITRE III ETUDE PHARMACODYNAMIQUE

I Action de l'Aubepine sur les vaisseaux

A) Activite spasmolytique

B) Action coronarodilatatrice

1. Mise en evidence in vitro d'une activité coronaro-dilatatrice

2. Mise en évidence in vivo d'une activité coronaro-dilatatrice

II Action de l'Aubepine sur la circulation sanguine

A) Action de l'Aubépine sur la pression artérielle

1. Action par voie parentérale chez l'animal narcosé
2. Action par voie orale chez l'animal vigil.

B) Action de l'Aubépine sur la circulation périphérique

III Action de l'Aubépine sur le fonctionnement cardiaque

A) Action de l'Aubépine sur la contractilité du myocarde

1. Etude in vitro

2. Etude in vivo

B) Action de l'Aubepine sur la fréquence cardiaque

1. Etude in vitro

2. Etude in vivo

C) Action de l'Aubépine vis-à-vis du coeur pathologique

1. Etude in vitro
2. Etude in vivo

D) Action anti-arythmique de l'Aubepine

E) Interaction de l'Aubépine avec les Glycosides cardiotoniques in vitro

1. Sur le coeur de l'animal à sang chaud

2. Sur le coeur de l'animal à sang froid

IV Action de l'Aubépine sur les métabolismes

A) Action de l'Aubépine sur le métabolisme respiratoire

B) Action de l'Aubépine sur le métabolisme lipidique

V Activite de l'Aubépine sur le système nerveux central

A) Activité d'un extrait total d'Aubépine et de certaines de ses fractions

1. Action de l'Aubépine sur la température corporelle
2. Potentialisation de la narcose barbiturique
3. Test de l'open-field
4. Conclusion des tests

C H A P I T R E I

E T U D E B O T A N I Q U E

CRATAEGUS - AUBEPINE

(SOMMITES FLEURIES)

Tribu des Mespilae
Famille des Rosacées
Sous famille des Pomoideae
Genre Crataegus

La legislation française reconnait comme officinales deux espèces différentes d'Aubépine (1).

Noms latins (22)

. Crataegus oxyacantha L : Crataegus oxyacanthoides Thuill ; Crataegus oxyacantha vulgaris Erndt ; Crataegus oxyacantha L α lobota Neilr ; Mespilus oxyacantha Crantz ; Crataegus laevigata (Poiret) de Candolle (Böhn) Dahn.

. Crataegus monogyna Jacq : Crataegus oxyacantha L var β laciniata Neilr ; Mespilus monogyna Willd ; Mespilus Elegans poir.

Noms vernaculaires (22)

. Français : Aubépine, Epine blanche, Epine de Mai, Noble épine, Bois de Mai, Poire d'oiseau, Sénellier

. Allemand : Weissdorn ; Rotdorn ; Heckdorn ; Hagedorn ; Einkern

. Anglais : Hawthorn ; Whitethorn ; Common hawthorn, May tree

. Espagnol : Spin Bianco ; Marruca bianca ; Bianco spino

. Italien : Azarolo selvatico

Origine du nom (22)

Crataegus vient du grec et signifie "force" à cause de la dureté de son bois ; d'autres auteurs traduisent "qui engendrent la force". Bonnier décompose le mot en force et chèvre : arbuste mangé par la chèvre et lui donnant de la force.

Oxyacantha : vient de pointer et épine, designation attribuee dans l'antiquite à divers arbustes épineux.

Répartition géographique (22)

L'Aubépine se trouve sur les sols calcaires, pauvres, secs et sablonneux, rocailleux, formant des sous-bois et des haies dans les forêts claires, isolés dans les forêts sombres, en buissons sur les pentes montagneuses, dunes, herbages, paturages, bords des chemins.

Cependant, on note quelques différences entre les deux espèces officinales :

CRATAEGUS OXYCANTHA THUILL	CRATAEGUS MONOGYNA JACQ
. Luxuriant sur sols lourds calcaires	. Luxuriant sur sols humeux nutritifs
. Se rencontre de la plaine à la montagne (900 m) et a un caractère européen et subatlantique : humidite atmosphère importante, faibles variations de temperature.	. Se rencontre de la plaine à la montagne (1800 m) car plus résistant. Appartient à l'élément euro-sibérien et est plus fréquent dans le Sud de l'Europe
. Frontière Nord : Grande-Bretagne Sud de la Suède	. Frontière Nord : Grande-Bretagne Norvège, Finlande
. Frontière Est : Pologne	. Frontière Est : Russie jusqu'au Caucase
. Frontière Sud-Est : Afrique du Nord	. Frontière Sud-Est : Arménie jusqu'en Himalaya, Syrie, Afrique du Nord
. Sa limite à l'Ouest (Amérique) est l'océan	. A l'Ouest (Amérique) sa limite est l'océan

Description botanique de l'Aubepine (22)

La description botanique de l'Aubépine devient difficile à cause de la tendance de cet arbuste à la "batardisation" et à l'hybridation. Il existe de nombreuses variétés de ces deux genres.

Pour Crataegus oxyacanthoïdes Thuill :

- Variété a vulgaris : forme habituelle donnant des formes cultivées dans les jardins, se differenciant par la couleur des fleurs
- Variété b integrifolia Wallr : forme petite

Pour Crataegus monogyna Jacq :

- Variété a typica Beck
- Variété b lanigera Beck : plus velu
- Variété c ferox
- Variété d flexuosa Loud à rameaux plus ou moins tordus
- Variéte f stricta Loud. à croissance pyramidale.

Il existe d'autre part des hybrides provenant du croisement de ces deux espèces et possedant les feuilles d'une espèce, les fleurs de l'autre :

- Crataegus media Bechst
- Crataegus intermedia Schur non Fuss ou ovalis kit
- Crataegus intermixta Beck

Crataegus oxyacanthoïdes et Crataegus monogyna sont des arbustes à croissance lente mais pouvant devenir très vieux. Crataegus oxyacantha reste essentiellement à l'état de buisson atteignant 1,8 à 4,5 mètres de haut, tandis que Crataegus monogyna est plus apte à donner des arbres pouvant atteindre 12 mètres de haut.

- Tronc et rameaux

Arbuste fortement ramifié à aspect en chevron, les branches collaterales pouvant former des angles de 90° avec les branches principales. Celles-ci donnent des rameaux à bois terminaux et pour pousses courtes latérales des lambourdes florifères de quelques centimètres ainsi que des dards transformés en épines en position latérale sur les rameaux à bois, les lambourdes ou à l'extrémité d'une branche.

Ces épines ont 1 à 1,5 cm de long chez Crataegus oxyacantha et 2,5 cm de long chez Crataegus monogyna.

L'écorce d'abord vert olive puis brûnatre, lisse et brillante devient glabre et gris clair à gris foncé sur les branches plus âgées, avec des lenticelles isolées. Sur les vieux exemplaires, l'écorce cède la place à une croute crevassée, mince écailleuse.

- Bourgeons

En mai à l'aisselle des feuilles apparaissent de petits bourgeons de taille inférieure à 1 mm, atteignant 4 mm au maximum en hiver. De forme sphérique à ovoïde, ils sont formés de 13 écailles brunes imbriquées, en forme de coquille à bords irrégulièrement dentés, ourlés à l'intérieur.

- Feuilles

Feuilles caduques, alternes, les plus grandes sont celles du tronc puis celles des rameaux à bois. Les plus petites sont représentées par les feuilles inférieures des lambourdes.

CRATAEGUS OXYACANTHA THUILL	CRATAEGUS MONOGYNA JACQ
Longueur : 2,5 à 4 cm Largeur : 3 à 5 cm Pétiole cannelé de 1 à 2 cm de long. Contour arrondi, oboval, cunéiforme à la base possedant à la moitié superieure 3, rarement 5, lobes emoussés, peu profonds atteignant le quart du limbe et garnis de dents pointues souvent doubles (9) (4). Base inférieure de la feuille souvent à bords entiers . Base supérieure vert brillante (4). Face inférieure matte, vert-clair avec des nervures latérales saillantes toutes tournées vers l'intérieur. Quelques rares poils sur les nervures	Longueur : 3,5 à 5 cm Largeur : 3 à 5 cm Pétiole cannelé de 1 à 3 cm de long Feuille à base cunéiforme ou rhomboïde, à limbe divisé en 3 ou 7 lobes profonds, aigus atteignant presque la nervure centrale, parfois garnis de dents à la partie supé-rieure du lot et devenant plus grandes vers le haut (9) (4). Base inférieure de la feuille à bords entiers. Face supérieure vert foncé mat (4). Face inférieure matte, vert-clair avec des nervures latérales saillantes toutes tournées vers l'extérieur. Quelques rares poils sur les nervures

° Stipules (22)

A la base des feuilles, stipules vert sombre de forme lancéolée, à bords entiers ou legèrement sciés, portant au sommet ou sur les dents de petites têtes glanduleuses.

Avant la floraison, les têtes glanduleuses se dessèchent et les stipules ont une forme de croissant ou de faucille à bords entiers ou irrégulièrement dentés, parfois sciés à divisés. Dans la forme croissant, la nervure principale parallèle au bord concave intérieur, partage le stipule en deux moities dissymétriques. Elles peuvent de même affecter une forme de rein.

° Inflorescence (9) (22)

Fleurs disposees en bouquets ou corymbes rameux, le plus souvent à l'extrémité de lambourdes latérales. Le pédoncule floral est à l'aisselle d'une feuille munie de stipules et porte dans sa moitié supérieure une à deux petites bractées qui se déssèchent et tombent avant la floraison, laissant de petites cicatrices rougeâtres brillantes caractéristiques.

CRATAEGUS OXYACANTHA THUILL	CRATAEGUS MONOGYNA JACQ
6 à 12 fleurs de 15 à 18 mm de diamètre par inflorescence munie d'un pédoncule floral glabre. Hypanthium ovoïde couronné de 5 sépales verts triangulaires (1/2 du tube) ovales acuminés, étalés et recourbés au sommet, glabres. Corolle : 5 pétales libres de 5 à 8 mm, suborbiculaires, blancs ou légèrement rosés, sphériques à larges ou allongés munis d'un onglet court à la base. Androcée : 15 à 20 étamines ou deux verticilles, les intérieures à filaments courts tournées en dedans, les extérieures plus longues et écartées vers le dehors. Anthères rouges (3). Gynecée : dans le réceptacle floral se trouve le stylopode vert-jaunâtre à partir duquel s'élèvent : deux à trois styles correspondant au nombre de carpelles adelphes au réceptacle. Chaque carpelle uniloculaire contient un ovule fructifère. Floraison : avril à juin	8 à 15 fleurs de 10 mm de diamètre par inflorescence munie d'un pédoncule floral velu. Hypanthium ovoïde couronné de 5 sépales verts triangulaires (3/4 du tube), lancéolés acuminés, souvent pubescents, se rabattant sur l'ovaire après la floraison. Corolle : 5 pétales libres de 5 - 6 mm, suborbiculaires, blancs ou légèrement rosés, sphériques à larges et allongés, munis d'un onglet court à la base. Androcée : 15 à 20 étamines ou deux verticilles, les intérieures à filaments courts tournées en dedans, les extérieures plus longues et écartées vers le dehors . Anthères noires (3). Gynecée : dans le réceptacle floral se trouve le stylopode vert-jaunâtre à partir duquel s'élèvent : un style correspondant à un carpelle uniloculaire avec un ovule fructifère. Floraison : avril à juin.

∘ Fruits (22)

<table>
<tr><th>CRATAEGUS OXYACANTHOIDES THUILL</th><th>CRATAEGUS MONOGYNA JACQ</th></tr>
<tr><td colspan="2">Pseudo-fruit appelé drupe, oval à rond, portant au sommet les pointes du réceptacle :</td></tr>
<tr><td>écartées du fruit
Fruit de 12 mm de diamètre</td><td>Droites autour du fruit
Fruit de 7 à 10 mm de diamètre</td></tr>
<tr><td colspan="2">Rouge brillant à brun rouge à l'extérieur, sa pulpe jaune de consistance farineuse contient :</td></tr>
<tr><td>deux à trois noyaux à face ventrale aplatie, sans tegument crouteux avec deux sillons obliques à bords dentés sur la surface intérieure, deux cannelures à la face dorsale.</td><td>Un noyau ovoïde pourvu d'un tégument croûteux, un peu veiné.</td></tr>
<tr><td colspan="2">A l'interieur des noyaux, une graine aplatie, pointue brun-chataigne.</td></tr>
<tr><td><u>Fructification</u> : septembre - octobre.</td><td><u>Fructification</u> : septembre - octobre.</td></tr>
</table>

∘ Partie utilisée ou drogue (4) (51) (2)

Sommites fleuries de Crataegus oxyacantha Thuill et Crataegus monogyna Jacq : corymbes qui peuvent porter à la base quelques petites feuilles, recoltés avant épanouissement complet, séches à température ambiante car la dessiccation à 40-70° diminue la teneur en flavonoïdes. On les sèche sur des toiles ou des claies en étendant les fleurs en couches minces dans un local bien aéré et sans trop les remuer pour ne pas les briser.

La drogue provient souvent des pays de l'Est (42).

a) Caractères macroscopiques et organoleptiques de la drogue (9)

Les fleurs ont un réceptacle brun-vert au bord supérieur formé de 5 dents (5 sépales triangulaires) : les 5 pétales forment une corolle de couleur blanc jaune à brun qui est généralement fermée en forme de bouton renfermant de nombreuses étamines brunes et friables.

Odeur faible et particulière.
Goût faiblement sucré à légèrement amer.

b) Caractères microscopiques de la drogue (18) (22)

- Pédoncule floral

La coupe transversale du pédoncule floral est celle d'un jeune axe :

. Epiderme de cellules à parois plus ou moins épaisses, convexes recouvrant 3 à 4 couches de cellules collenchymateuses riches en chlorophylle

. Parenchyme cortical de cellules à grand lumen, paroi fine avec de nombreux espaces intercellulaires.

. Endoderme peu différencié

. Péricycle à plusieurs couches entourant un tissu de petites cellules

. Moëlle formée de cellules à paroi mince

. Vaisseaux conducteurs rayonnants non accompagnés de fibres libériennes.

. Rayons médullaires unisériés.

° Fleur

La coupe transversale au niveau du réceptacle floral montre de l'extérieur vers l'intérieur :

. un épiderme de cellules assez petites, isodiamétriques, à paroi externe épaissie

. une à deux couches de cellules à paroi peu épaisse (prolongement du collenchyme du pédoncule floral)

. Parenchyme à grandes mailles, lâche

. l'intérieur du carpelle est recouvert d'une couche de cellules petites et sombres, ressemblant à un épiderme

. contre le réceptacle floral creux, deux couches de l'axe pulpeux : * une couche extérieure claire, riche en chlorophylle, de cellules allongées dans le sens de l'axe, parcourue à intervalles réguliers de faisceaux conducteurs sans liber.

* une couche interne brune à cellules allongées radialement

. au niveau de l'ovule : aspect de cellules embryonnaires. Présence de nombreux cristaux d'oxalate de calcium et de poils à la face intérieure de la coupe du réceptacle et du stylopode (18).

Sépales

- A la partie inférieure des sépales, l'épiderme des deux faces est formé de cellules polygonales non mucilagineuses avec des parois faiblement ondulées, isodiamétriques en coupe transversale.

Elles possedent des parois externes convexes et sont recouvertes d'une cuticule plissée. L'épiderme de la face externe est de plus, pourvu de stomates de forme presque ronde, un peu surelevés et de poils courts et epais : poils simples unicellulaires, à lumen large, allongés, courbés, parfois tordus dans le sens de la longueur avec un pied arrondi ou en forme de quille, parfois soulevé par un socle formé par les cellules collatérales épidermiques. La destruction du poil montre alors un socle creusé en forme de bol. Les poils sont mouchetés à la base.

Mésophylle : tissu lâche, riche en chlorophylle, contenant des cristaux isoles d'oxalate de calcium ; absence de tissu palissadique et de parenchyme lacuneux.

Presence de faisceaux conducteurs vers le bord externe.

- A l'extrémité supérieure de la pointe des sépales :

Face externe formée par un épiderme de grandes cellules mucilagineuses, boursouflées avec des ilots de cellules non mucilagineuses.

Mésophylle pourvu d'un tissu palissadique.

Face interne formée de cellules rondes, arrangées de façon assez dense, recouvertes d'un épiderme avec des cellules mucilagineuses isolées, et une cuticule fortement ondulée-rayée(67).

Pétales

- Epiderme externe de cellules polygonales à parois minces et parois latérales droites, un peu plus larges que hautes en coupe transversale et parois externes un peu cintrées. Au bord, stomates isolées, ovales, sans cellules péristomatiques nettes. Elles sont recouvertes d'une cuticule ondulée rayée.

- Mésophylle lâche de cellules polygonales étirées dans le sens de la longueur à parois latérales légèrement onduleuses, possédant des saillies en forme de côtes, parallèles à la face supérieure.

- Les cellules épidermiques de la face intérieure du pétale sont fortement papilleuses, polygonales et irrégulières vues du dessus, épaissies en coupe transversale, recouvertes d'une cuticule fortement ondulée - rayée (67).

A la base du pétale, et près des faisceaux conducteurs, petits cristaux d'oxalate de calcium (18).

Filament des Etamines - Anthères

- Epiderme de cellules à parois minces, papilleuses, cintrées vers l'extérieur, recouvertes d'une cuticule striée transversalement.
- Au dessous, tissu lâche, riche en espaces intercellulaires, de cellules allongées dans le sens de l'axe, contenant des cristaux d'oxalate de calcium (67).
- Un petit faisceau conducteur entouré d'un parenchyme à fines mailles, passe par le milieu du filament.
- L'exothélium des anthères est constitué de cellules à parois fragiles, plus larges que hautes en coupe transversale.
- L'Endothélium possède des épaississements réguliers en forme de cintre.
- Couche de fibres avec de grandes cellules allongées radialement.

Grains de Pollen

De forme ovale, tricorne à exine lisse et trois pores germinatifs, de 44µm (9) (18).

Style

Les cellules épidermiques du style sont allongées, rectangulaires avec des rides cuticulaires transversales. Nombreux cristaux d'oxalate de calcium isolés dans le parenchyme (18).

° Feuille

Une coupe transversale de feuilles montre :

* A la Face supérieure :

- Epiderme de cellules à contour polyédrique, faiblement onduleuses, plus hautes que larges, à parois internes fortement épaissies et mucilagineuses.
Elles sont recouvertes d'une cuticule épaisse, le plus souvent lisse avec des rayures seulement au-dessus des vaisseaux.
Absence de stomates.

- Tissu polissadique contigu formé de deux couches de cellules

- Parenchyme lacuneux lâche formé de 4 à 5 assises de cellules rondes et allongées.

* A la Face inférieure :

- Epiderme formé de cellules à parois latérales fortement onduleuses, rarement mucilagineuses. Allongées à presques rondes, elles sont un peu plus petites que les cellules de l'épiderme supérieur, et ont des parois épaisses et cintrées au dessus des vaisseaux. Les parois cellulaires forment des excroissances apparaissant sous forme de papilles ou de protubérances en forme de dents, réfringentes.

Elles sont recouvertes d'une cuticule présentant des formations fortes et larges ou de fines rayures en particulier au niveau des vaisseaux et des rides concentriques autour des stomates de type anomocytique (18).

* Au niveau de l'appareil conducteur

- Les gros vaisseaux conducteurs accompagnés de cellules libériennes à paroi épaisse, sont surmontés de cellules collenchymateuses. A la face inférieure, on trouve en dessous 2 à 3 couches de cellules parenchymateuses épaissies, accompagnées de fibres cristalligènes.
- Les plus petits faisceaux ne possèdent pas de liber et sont enveloppés dans un parenchyme non épaissi.
- Entre le tissu palissadique et le parenchyme lacuneux, présence de trachéides alvéolées, ponctuées.
- Sur les nervures, poils peu abondants : unicellulaires, à paroi plus ou moins épaisse, lumen large, presque droits ou plus ou moins courbés et tordus, émoussés ou effilés, ponctués à la base (18).

° Stipules

La stipule a la même constitution que la feuille : épiderme, tissu palissadique, parenchyme lacuneux. Stomates à la face inférieure.
Présence de cristaux d'oxalate de calcium.

On peut y reconnaître des restes des formations glanduleuses (petite tête sphérique reliée par une tige à la pointe des stipules, qui tombe avant la floraison formant ainsi une dent) sous forme de petites pointes brunes sur les dents de la stipule.

c) Caractères microscopiques de la poudre (9)

Couleur vert-jaune

Fragments de pétales avec un épiderme de la face interne papilleux , polygonal avec une cuticule ondulée-rayée (67)

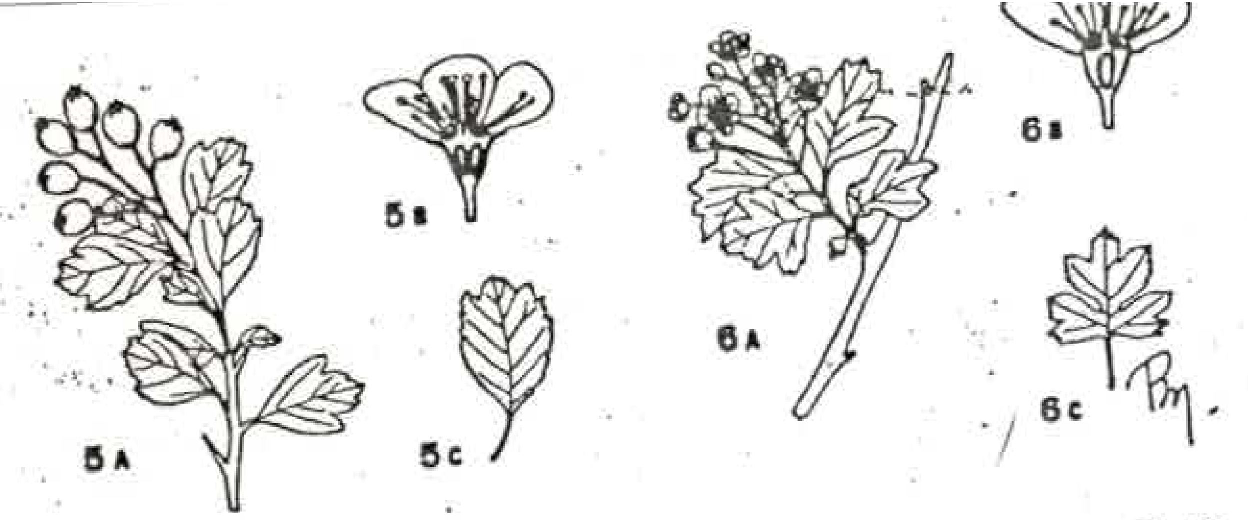
Nombreux poils tecteurs unicellulaires, tordus à rectilignes, à parois épaisses et non ponctuées, mouchetés à la base (18) : ces poils sont soit libres, soit fixés sur l'épiderme du réceptacle.

L'épiderme du réceptacle est formé de petites cellules polygonales et cuticule onduleuse, dont le mésophylle contient de nombreuses mâcles d'oxalate de calcium.

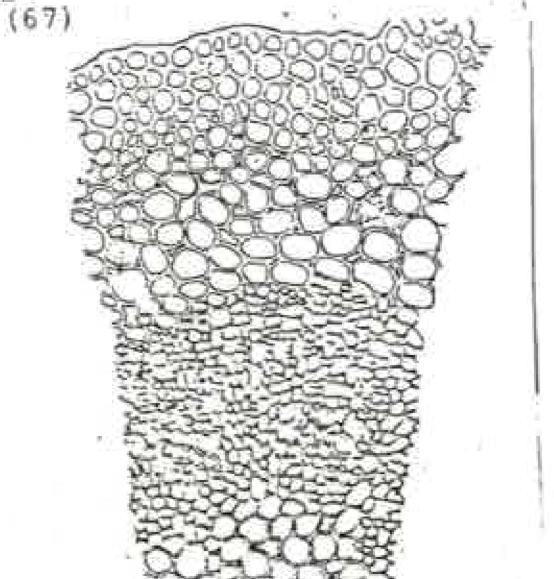
Les cellules formant l'assise mécanique des anthères sont fortement striées, et leur paroi épaisse est formée par une succession de renflements.

Les grains de pollen nombreux, pouvant atteindre la taille de 44 µm ont une forme triangulaire à angles arrondis. Ces grains à exine lisse présentent 3 pores.

Morceaux de tissu avec des cellules épidermiques allongées, cintrées vers l'extérieur et des plis cuticulaires transversaux (67).



5 Aubépine à deux styles, Crataegus oxyacanthoides Thuill.
A un rameau fructifère
B une fleur, en C.L.
C une feuille
6 Aubépine à un style, Crataegus monogyna Jacq.
A un rameau florifère
B une fleur, en C.L.
C une feuille
(67)

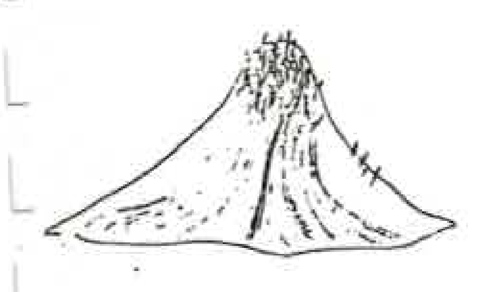


Coupe transversale du pédoncule floral (22)



oil tecteur
doncule floral

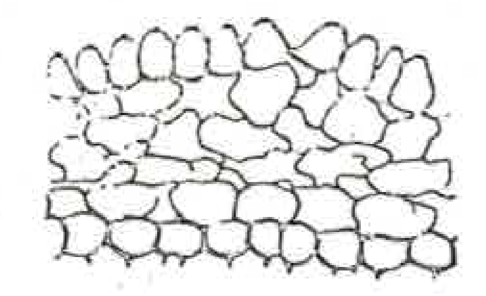
Stipule (22)



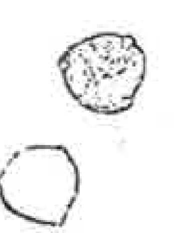
Sépale de Cr. oxyacantha (22)



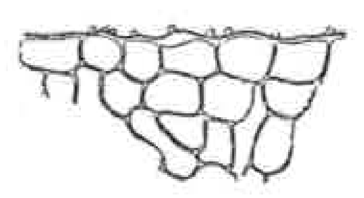
Pétale Crataegus oxyacantha (22



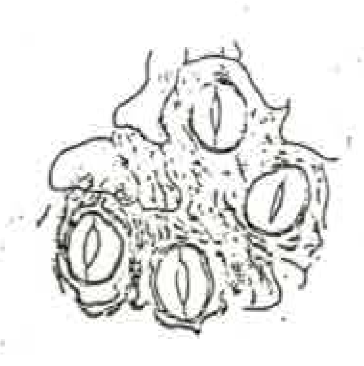
Coupe transversale de pétale (22)



Grains de Pollen (22)



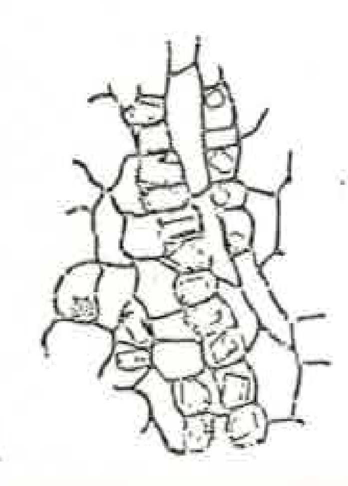
Feuille - Epiderme inférieur - coupe transversale (22)



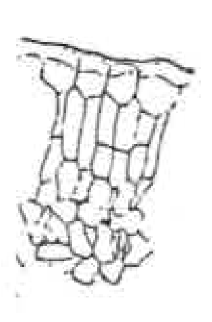
Feuille : face inférieure (stries cuticulaires) (22)



Feuille - Epiderme inférieur vue de dessus (22)



Feuille avec fibres cristalligènes



Feuille - Epiderr Supérieur et mésophylle (coup transversale)

AUBEPINE

d) ESSAI

Parties étrangères et falsifications

. Parties ligneuses (tiges des années précédant celle de la récolte) ≤ 5 % du poids de la drogue (9).

. Autres Crataegus (18)
Les autres Crataegus ne sont pas officinaux en France (1)

NOM	ORIGINE	FLEURS	FEUILLES
Crataegus pentagyna Wald st et Kit ex Willd	Balkans	5 Styles Ovaire velu sur le sommet	Poilues à la face inférieure
Crataegus nigra Waldst et Kit	Yougoslavie Hongrie	4 à 5 styles Etamines aussi longues que les pétales	face inférieure garnie d'un feutrage de poils sur les nervures
Crataegus azarolus	Italie Europe de l'Est	2 à 3 styles	Feuilles à 3-7 lobes poilues-feutrées.

. <u>Substitution (9)</u>

Il ne doit pas y avoir :

* de fleurs de Prunus spinosa (Prunellier) : ovaire constitué par un carpelle unique libre au centre de la coupe réceptaculaire. Feuilles à limbe entier, ovale aigu, à bords denticulés (18).
* de fleurs de Sorbus sp : 2 ovules dans la loge ovarienne
* de fleurs de Robinia pseudoaccacia L . Fleurs caractéristiques de papilonacées.

Culture de l'Aubépine (22)

1- <u>A partir des graines</u>

Les graines ou les fruits sont plantes directement sur des plates-bandes à l'automne, au printemps ou après un an passé dans le sable humide dans une cave car la graine d'aubépine ne germe qu'au bout de deux ans environ.

Elle est alors plantée à l'automne suivant. Gardée durant deux ans après la germination, elle est replantée en terre la quatrième année.

2- Reproduction par multiplication végetative

A partir de plates-bandes fertiles d'arbres vigoureux que l'on coupe à 8 cm au dessus du sol, on laisse se développer la première année 2 à 3 pousses. Dès que les jeunes pousses ont atteint 3 cm la deuxième année, il faut enfoncer les branches à 5-8 cm au dessous du sol. La pousse sort de terre et donne en même temps des racines. En deux ans, une plante donne ainsi 60 jeunes plants.

L'aubépine est ainsi très utilisée comme arbre d'ornementation et surtout pour faire des haies et des clôtures.

Maladies de l'Aubépine (22)

L'Aubépine est sensible à tous les parasites des Prunus et Ficus.

Certains sont spécifiques :

* Eriophyes goniothorax Nol : Galle provoquant la boursouflure du bord de la feuille ; elle renferme un feutrage de poils.
* Dasyneura crataegi Winn : Mouche de la galle dont les larves jaunâtres puis rougeâtres déforment les extrémités des pousses ; les feuilles ne se développent pas. L'arbre porte des emergences rondes dont les sécrétions nourrissent les larves.

* Myzus Crataegi Koch : Puceron provoquant des tumeurs vésiculeuses rouges de la face supérieure de la feuille.

. Dentatus crataegi : Puceron provoquant une accumulation de touffes de poils sur les feuilles.

* Gymno sporangium confusium : champignon qui déforme tige - feuilles - fleurs.

CHAPITRE II

ETUDE ANALYTIQUE

I FLAVONOIDES DES FLEURS ET FEUILLES DE L'AUBEPINE

A MISE EN EVIDENCE QUALITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE COUCHE MINCE (34) (66)

Solution à examiner : 1 g de drogue pulvérisée (500) + 10 ml Méthanol R extrait au bain-marie sous agitation 10 minutes à 60°c. On soumet 10 à 20 µl de filtrat à la chromatographie.

Support = Kieselgel 60F254

Phase mobile= Acetate d'éthyle 50 (66)
Ethylméthylcetone 30
Acide Formique 7
Acide Acetique 3
Eau 10

Acétate d'éthyle 100 (34) (37)
Acide Formique 20
Eau 30

Détection : Pulvérisation d'une solution méthanolique à 1 % de diphenylboroxyéthylamine puis de polyéthylène glycol à 5 % en solution ethanolique. Observation aux UV 365 nm.

Résultat (37) : Dans le second système de solvant sont identifiés quelques flavonoïdes.

Vitexine	Rf = 0,7	Fluorescence jaune
Hyperoside	Rf + 0,67	Fluorescence orange
Glycoside de la Quercétine	Rf = 0,65	Fluorescence orange
Vitexine Rhamnoside	Rf = 0,42	Fluorescence jaune
Rutine	Rf = 0,40	Fluorescence orange.

La solution d'hydrolyse est diluée avec la même quantité d'eau, passée sur une colonne contenant 3 grammes de polyamide, lavée à l'eau jusqu'à réaction neutre → Solution acide que l'on neutralise par passage sur une colonne de résine échangeuse d'anions pour étudier les sucres par chromatographie sur papier (méthode ascendante).

Eluants = Butanol - Acide Acétique Eau (4-1-5)
= Butanol - Pyridine - Eau (6-4-3)

Révelateur : Phtalate d'aniline (0,93 g d'aniline + 1,66 g d'acide phtalique pour 100 ml de butanol saturé d'eau).

Eluer l'aglycone de la colonne de polyamide avec du méthanol pour contrôle chromatographique.
Révélateur = Solution méthanolique à 1 % de diphenylboroxyéthyl amine. Observation aux UV 365 nm.

C FLAVONOIDES IDENTIFIES DANS LES FLEURS ET FEUILLES DE CRATAEGUS MONOGYNA

1- Aglycones libres

a- Quercétine (37) (49)

= Penta hydroxy 3, 5, 7, 3', 4' flavone

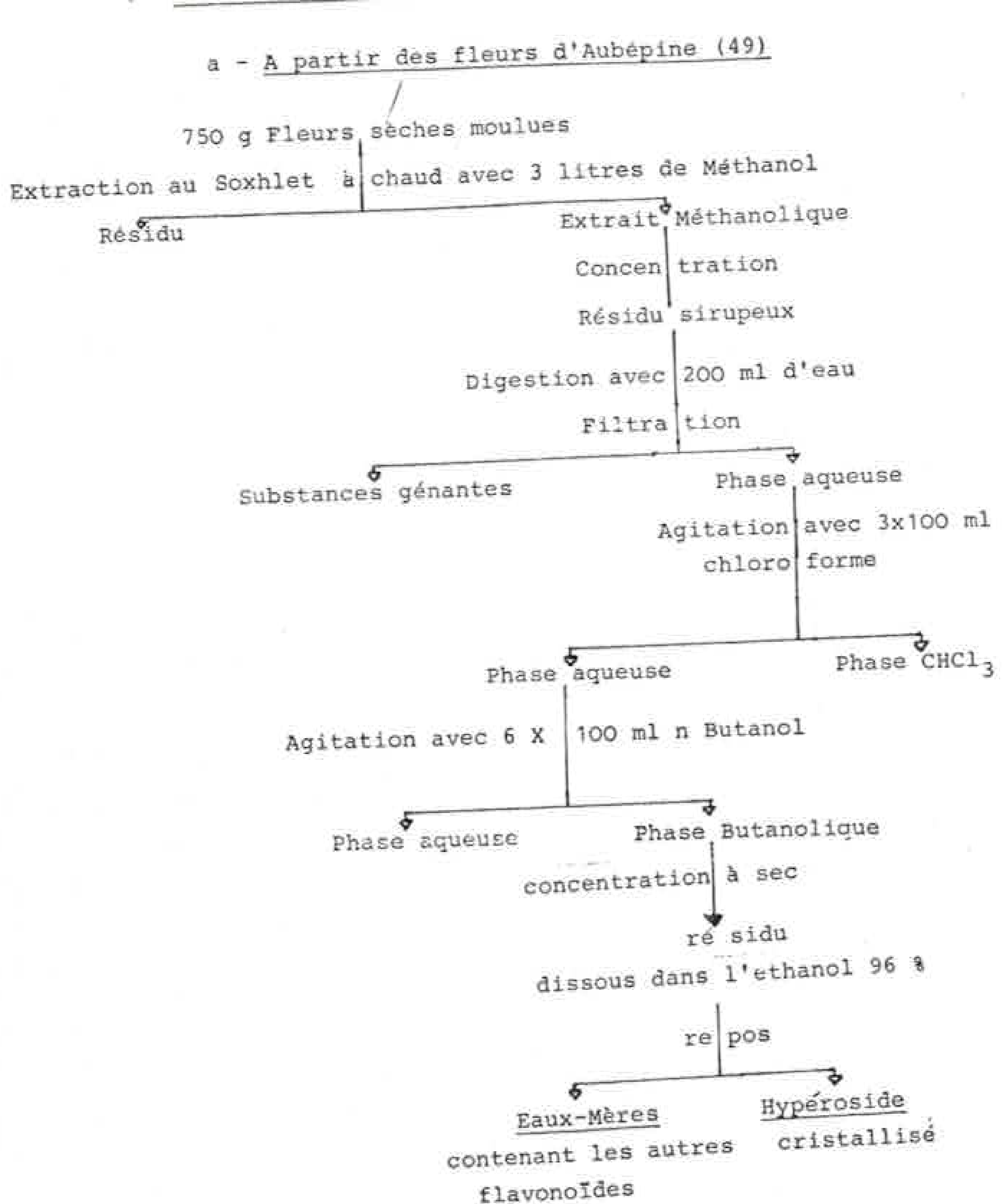
HO, OH, OH, OH, OH, O

Point de Fusion = 310-12°C

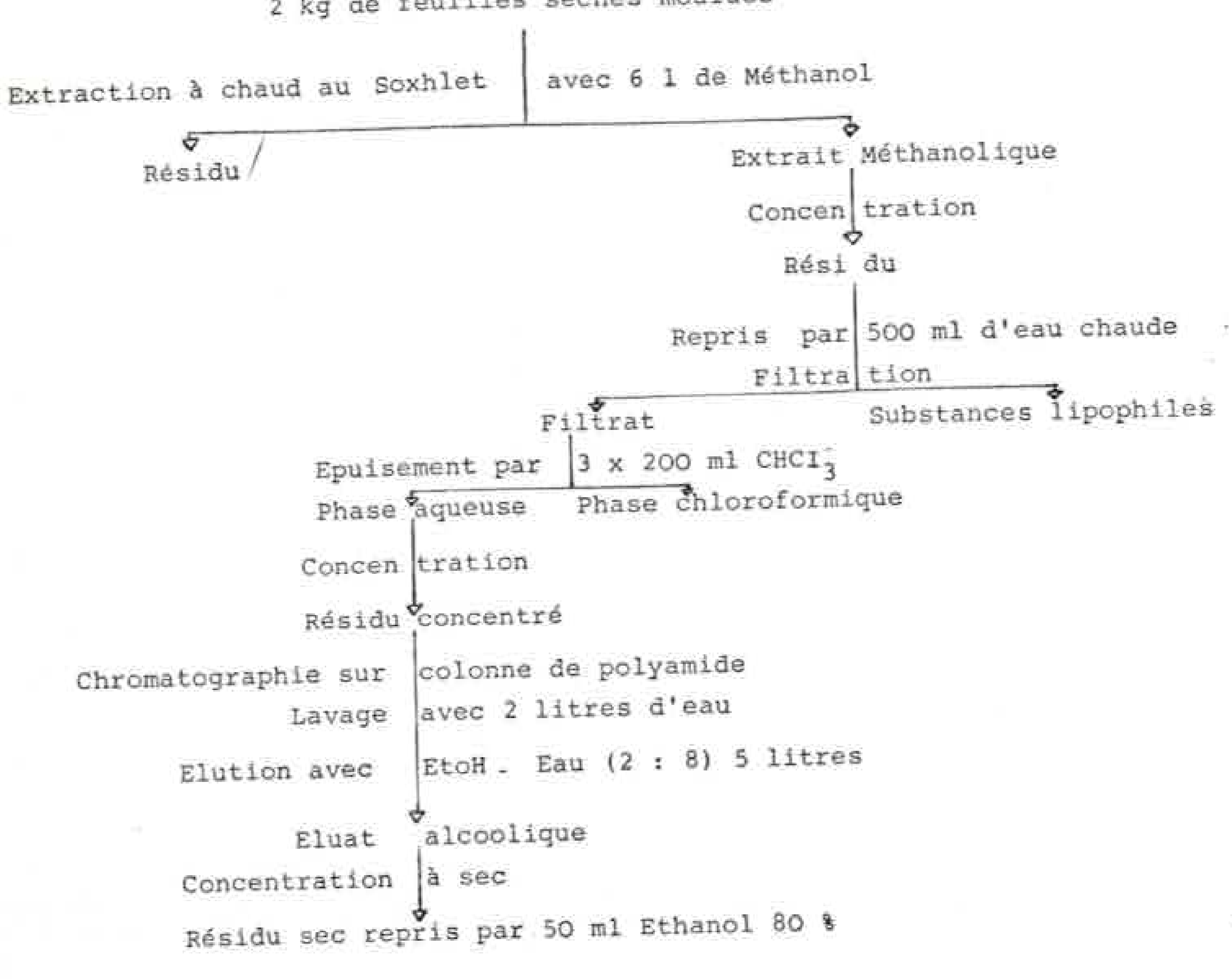
B EXTRACTION ET ISOLEMENT DES FLAVONOIDES DE L'AUBEPINE

1 - Extraction des Flavonoïdes totaux (49)

a - A partir des fleurs d'Aubépine (49)



b - A partir des feuilles d'Aubépine (49)



= Flavonoïdes totaux

2 - Isolement individuel des Flavonoïdes

a - Par chromatographies préparatives répétées

sur papier FN-7 on Whattman 3MM (49) de la fraction flavonoïde.

Eluants = BAW n Butanol. Acide Acétique Eau (4-1-2) - Acide Acétique 15 %

b - Par chromotographie sur colonne

de polyamide lavée à l'eau, puis éluée avec de l'éthanol 20 % - 30 % - 50 % - 80 % (37).

3 - Méthodes d'étude des Flavonoïdes isolés

a - Identification par leurs propriétés physico-chimiques

- Point de fusion
- Spectre de masse du composé perméthylé
- Spectre RMN du composé peracétylé
- Comportement chromatographique sur papier Whattman 3MM ou FN-1 dans BAW 4-1-2 ou acide acétique 15 %.

b - Identification des produits de l'hydrolyse

b-1 Pour les O. Hétérosides (49)

Hydrolyse acide avec HCl 5% 1 heure au bain-marie bouillant.

Hydrolyse acide avec l'acide acétique 10 % 5 heures au bain-marie bouillant.

b-2 Pour les C. Hétérosides (26)

Hydrolyse acide avec H_2SO_4 2N 1 heure au bain-marie bouillant.

Hydrolyse de Kiliani avec pour 10 mg de flavonoïde : 3 ml d'un mélange fait de 35 ml d'Acide Acétique glacial + 55 ml d'eau + 10 ml HCl 37 % pendant 4 heures au bain-marie bouillant.

Rf Papier Whattman 3MM BAW (4-1-2) = 0,71
Spectre Ultra-Violet (Ethanol) λ max nm = 257 - 371

b- Kaempférol (37) (49)

= Tetra hydroxy 3, 5, 7, 4 flavone

Rf Papier Whattman 3MM BAW (4-1-2) = 0,80
Point de Fusion = 278.280°C

2- O- Hétéroside de la Lutéoline (49)

Lutéoline 7-O Glucoside

Point de fusion = 255-257°C

3- O - Hétéroside du Kaempférol (49)

8 Méthoxy Kaempférol 3 O βD Glucoside $C_{22}H_{22}O_{12}$ (0,00 4%)

Point de fusion = 223 - 225°C ($EtOH/H_2O$)

Rf Papier FN-1 BA W (4-1-2) = 0,75

Acide Acétique 15 % = 0,62

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20} = -6,6°$ (Et OH, c = 0,1)

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) :

MeoH	223*	272	323	360	
+ Na OAc	282	315	402		
+ H_3BO_3	273	320	362		
+ $AlCl_3$	234	280	310	353	407

Produits de l'hydrolyse acétique :

. Sucre = glucose

. Aglycone = 8 Methoxy Kaempférol

Point de fusion = 283 - 286° (EtOH 70%)

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) :

MeoH	221	254*	272	323	372
+ NaOAc	281	317	410		
+ H_3BO_3	272	325	375		
+ $AlCI_3$	227	259	271		

Spectre de masse m/e et intensité relative :

316 M^+ (71) ; 301 $M-15^+$ (100) ; 273 (11) ; 167 (6) ; 158 M^{++} (17); 150 $5M^{++}$ - 15 (11) ; 147 (8) ; 121 (20) ; 93 (6) ; 69 (49), 65 (7).

4- O - Hétérosides de la Quercétine

a- Hyperoside = Galactoside - 3 quercétine (37) (49)

Rf Papier Whattmann 3MM BAW (4-1-2) = 0,62

Acide Acétique 2 % = 0,11

Spectre Ultraviolet λmax (nm) :

MeOH	257, (268,305), 360
MeOH + Na OH	270, (325), 417
MeOH + Na OAc	270, 325, 395
MeOH + Na OAc+ H_3BO_3	260, (290), 380
MeoH + $AlCl_3$	273, (301,340), 425
MeoH + $AlCl_3$ + HCl	270, (295, 356) 403

Produits de l'hydrolyse acide = Galactose + Quercétine

b- <u>Rutine</u> Rhamnoglucoside - 3 Quercétine (27) 0,004 %.

Point de fusion = 195-198° (EtOH/H_2O)

Pouvoir rotatoire = - 30° (MeOH, c = 0,5)

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2)) = 0,50

Acide Acétique 15 % = 0,58

c- <u>Rhamnogalactoside - 3 Quercétine</u> (27) (37) (49)

Cet héteroside migre en même temps que la rutine et a le même spectre Ultra-Violet

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) :

EtOH	258*	361	
EtOH + $NaOC_2H_5$	273	274	415
EtOH + CH_3COONa	270	390	
EtOH + H_3BO_3 + CH_3 COONa	264	386	
EtOH + $AlCl_3$ 6 H_2O	270	409	

d- Crataeside = 3' O Arabinosyl Quercétine (47)

$C_{20}H_{18}O_{11}$

Rendement dans les feuilles = 0,002 %

Point de Fusion = 220-23°C

Rf Papier dans Acétate d'éthyle.Acide formique.Eau (10-2-3) = 0,33

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) :

MeOH = 253 268* 364.

Pas de déplacement batochrome en présence de H_3BO_3 et Acétate de Sodium.

L'hydrolyse sulfurique libère : Quercétine + L Arabinose.

e- Spiraeoside = Quercétine 4' Glucose (49)

OH

HO — — O – Glu

OH

OH O

$C_{21}H_{20}O_{11}$ Rendement = 0,002 %

Point de Fusion = 211-214° (Acétone/Eau)

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20}$ = - 59° (MeOH, c = 0,3)

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,59

Acide Acétique 15 % = 0,11

5- C - Hétérosides de l'Apigénine

a- Vitexine = Glucosyl 8C de l'Apigénine (37) (49)

Glu

HO — — OH

OH O

Point de Fusion = 262 - 264°

Rf Papier Whattman 3MM BAW (4-1-2) = 0,73

Acide Acétique 2 % = 0,13

b- Isovitexine: 6C glucoside de l'Apigénine (37) (49)

Point de Fusion = 240 - 242°

Même Rf chromotographique que la Vitexine.

c- 2" O Rhamnosyl Isovitexine (49)

$C_{27}H_{30}O_{14}$

Existe à l'état de traces chez Crataegus monogyna

Point de Fusion = 216-218°C (Acétate d'éthyle/MeOH)

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,62

Acide Acetique 15 % = 0,85

Spectre Ultra-Violet λmax (nm) :

MeOH	213*	271	332				
MeOH + NaOAc	278	312	334	395			
MeOH + H_3BO_3	271	341					
MeOH + $AlCl_3$	.218*	231*	260*	278	303	355	390*

L'hydrolyse par l'acide acétique libère de l'Isovitexine (Saponarétine) et du Rhamnose.

Le rhamnose est lié par une liaison O.hétérosidique en C -2"-OH du glucose.

d- 2" O Rhamnosyl Vitexine (49)

$C_{27}H_{30}O_{14}$ Rendement = 0,0075 %

Point de Fusion = 213 - 215° (Acétone/H_2O)

Pouvoir rotatoire = $(\alpha)^{20}_{D}$ = - 82°,0 (EtOH c = 0,6)

L'étude des spectres UV et RMN de l'hétéroside et de son dérivé perméthylé permet d'affirmer que la structure n'est pas celle annoncée auparavant, la Vitexine 4' Rhamnoside (26).

Spectre Ultra Violet λmax (nm)

MeOH	213*	269	300	331	
MeOH + NaOAc	279	313	333	390	
MeOH + H_3BO_3	270	310	345		
MeOH + $AlCl_3$	218*	277	304	350	386*

Spectre RMN de l'Hétéroside (Pyridine TMS)

δ = 1,26 ppm (d, J = $6H_2$) Rha-CH_3
3,39 ppm (m, 1H) Rha-CH-5
3,85 - 4,88 ppm (m, 8H)
5,18 ppm (t, J = $9H_2$ 1H) Glu - CH - 2
5,85 ppm (d, J = $9H_2$ 1H) Glu - CH - 1

6,35 ppm

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,52
Acide Acétique 15 % = 0,71

Produits de l'hydrolyse acetique = Vitexine + Rhamnose.

e- 2" O Rhamnosyl - (4''' o acétyl) Vitexine (49)

$C_{29}H_{32}O_{15}$ Rendement = 0,0015 %.

Point de Fusion = 252 - 254°c (Acétate d'Ethyle)

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20}$ = - 69,0° (EtOH c = 0,6)

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,72
Acide Acétique 15 % = 0,78

Spectre Ultra-Violet identique à celui du 2"O Rhamnosyl Vitexin

Spectre Infra-Rouge (KBr)

ν = 3400 cm^{-1} OH
1705 cm^{-1} (ester c = O)
1650 cm^{-1} (Flavone c = O)

Spectre H RMN (Pyridine - d_5, TMS)

δ = 1,02 ppm (d, J = 6 H_z 3H) Rha CH_3
2,04 ppm (5,3H) CH_3CO
3,15 ppm (m,1H) Rha - CH - 5
3,90 - 4,65 ppm (m, 7H) Rha - CH - 2,3 Glu - CH - 3,4,5,6,6
4,99 ppm (t,J = 9H_2, 1H) Glu - CH - 2
5,38 ppm (t - J = 8H_2, 1H) Rha - CH - 4
5,80 ppm (d, J = 9H_2, 1H) Glu - CH - 1
6,31 ppm (Sbr, 1H) Rha - CH - 1.

Produits de l'hydrolyse acétique = Vitexine + Rhamnose.

Par saponification avec Na OH 1% : obtention d'acide acétique confirmant la présence d'un groupe acétyl.

f- Isoschaftoside :6-C- Arabinosyl - 8-C- glucosyl - Apigénine (49)

Point de Fusion = 230-232°

g- Schaftoside = 6-C Glucosyl - 8.C pentosyl Apigénine (49)

h- Néoschaftoside = 6 - C - Hexosyl - 8.C pentosyl Apigénine (49)

i- Néoisoschaftoside = 6-C Pentosyl - 8-C- hexosyl Apigénine (49)

j- Vicénine 1 = 6.C - Xylosyl - 8.C - glucosyl Apigénine (49)

k- Vicénine 2 = 6,8 DiC glucosyl Apigénine (48) (49)

Spectre Ultra-Violet (MeoH) λmax(nm) = 275 310* 336

L'hydrolyse en milieu liquide plénol par l'acide iodhydrique libère Glucose + Apigénine.

1- Vicénine 3 = 6 C glucosyl - 8C xylosyl Apigénine (49)

6- C - Héterosides de la Lutéoline

a- Orientine = Glucosyl 8-C / Lutéoline (46) (49)

$C_{21}H_{20}O_{11}$

Point de Fusion = 260-262°C

Pouvoir rotatoire $(\alpha)^{20}_{D} = + 22°$ (c = 0,1 Pyridine)

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) = 255 271* 348

Non hydrolysable par l'acide sulfurique 20 % en 4 heures, l'hydrolyse par l'acide iodhydrique en milieu phénol liquide donne Lutéoline + Glucose

b- Isoorientine = 6C Glucopyranosyl - Lutéoline (46) (49)

HO
Glu
OH
O
OH
OH

$C_{21}H_{20}O_{11}$

Point de Fusion = 229-231°C

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20}$ = + 54°C (c = 0,1 Pyridine)

Spectre Ultra-Violet λ max (nm) = 256, 270*, 349

Spectre Infra-Rouge : γ=1740 cm^{-1}

L'hydrolyse par l'acide iodhydrique en milieu liquide phénol libère Lutéoline + Glucose.

c- 2" O Rhamnosyl Orientine (49)

Néohesperidosyl
HO
OH
O
OH
OH

$C_{27}H_{30}O_{15}$ A l'etat de traces dans Crataegus monogyna

Point de Fusion = 223-225° (EtOH/Acetone)

Rf Papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,47
Acide Acétique 15 % = 0,60

Spectre Ultra-Violet λ max (nm)

MeOH	255	269	343	
MeOH + NaOAc	276	325*	398	
MeOH + H_3BO_3	264	373	435*	
MeoH + $AlCl_3$	275	305*	334	430
MeOH + $AlCl_3$/HCl	275	298	359	390

Produits de l'hydrolyse acide acétique = Orientine + Rhamnos

d- <u>2" O Rhamnosyl Iso orientine (49)</u>

$C_{27}H_{30}O_{15}$ A l'état de traces dans Crataegus monogyna

Point de Fusion = 218-220°C (EtOH/Acétone)

Rf papier FN-1 BAW (4-1-2) = 0,49
Acide Acétique 15 % = 0,70

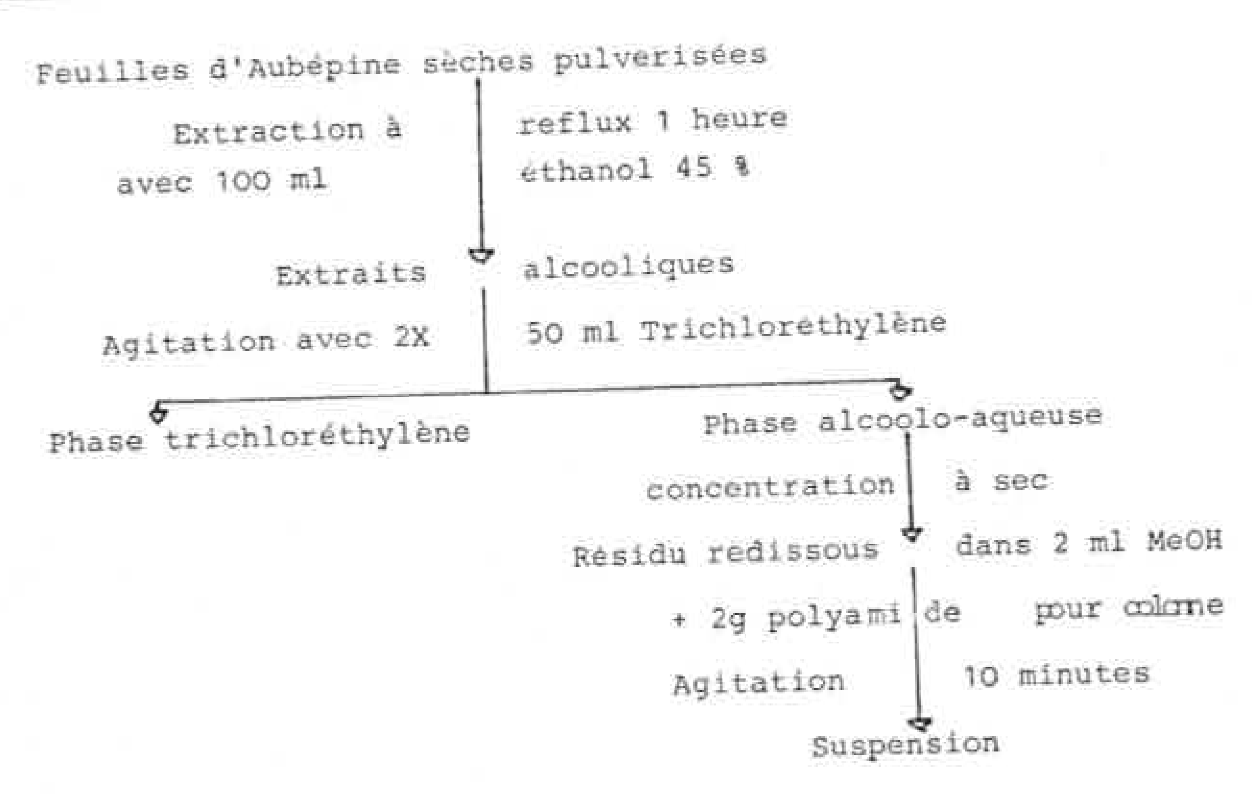
II PROANTHOCYANIDINES DES FLEURS ET FEUILLES DE L'AUBEPINE

Definition des Proanthocyanidines (34) = Substances de type flavonoïde qui par chauffage avec un acide minéral donnent une cyanidine colorée en rouge. Présentes dans feuilles et fruits, elles participent à la qualité, couleur, goût.

On les sépare en deux groupes :

- Leucoanthocyanidines = monomères, dimères et polymères de flavannes 3,4 diols parfois associés à des flavannes 3, ol.
- Proanthocyanines = dimères, polymères de flavannes - 3, ol (catechine et épicatéchine).

A EXTRACTION DES PROCYANIDINES (34)



Selon la DAB_8, la teneur minimale des Fleurs + Feuilles = 0,7 % exprimé en Hyperoside.

2- Dosage spectrophotométrique des Flavonoïdes totaux (50)

Réactif = 1,81 g $AlCl_3$ $6H_2O$ dissous dans 50 ml de méthanol à 5 % d'acide acetique.

Solution standard = 0,04 g K_2CrO_4 dissous dans KOH (0,05 mole/l.). Diluer à 1 litre.

Solution à examiner = 0,02 g de flavonoïdes totaux dissous dans 50 ml de méthanol. Prélever 10 ml de solution et diluer à 100 ml avec du méthanol = Solution S.

Dosage :

10 ml de solution S + 1 ml de réactif + méthanol. Compléter à 25 ml. avec le méthanol.

Après 30 minutes, mesurer l'absorption de la solution (=As) à 276 ± 2 nm contre un blanc réactif traité de la même manière.

L'absorption de la solution standard (Ast) est mesurée contre l'eau à la même longueur d'onde.

$$\% \text{ de Flavonoïdes} = \frac{A_S \times 0,001 \times 0,725 \times 100}{A_{ST} \times 0,0004}$$

0,725 = Facteur de correction convertissant K_2CrO_4 en Vitexine rhamnoside.

Conduite du dosage

a- injection de 10 µl de solution étalon pour repérer les pics des flavonoïdes et évaluer les facteurs de correction standard par rapport à l'étalon interne.

Facteur de correction standard de chaque substance = f

$$f = \frac{\text{Surface du pic de la Substance} \times \text{quantité de Quercitrine pesée}}{\text{Surface du pic de la Quercitrine} \times \text{quantité de Substance pesée}}$$

b- Injection de 10 µl de solution à examiner

- on dose individuellement les flavonoïdes identifiés par leur temps de rétention par rapport à la solution étalon

$$\text{\% Substance} = \frac{\text{Surface du pic de la Substance} \times \text{Quantité de Quercitrine} \times 100}{f \times \text{Surface du pic de la Quercitrine} \times \text{Poids échantillon}}$$

- Dosage des flavonoïdes non identifiés : Il se fait en additionnant la surface des pics des substances non identifiées, en tenant compte de la présence des pics des acides phénoliques (chlorogénique et caféique), seules substances interférant à 340 nm dans l'extrait et en utilisant pour facteur de correction celui de l'Hypéroside.

- Flavonoïdes totaux = Somme des pourcentages des teneurs en principaux flavonoïdes et "autres flavonoïdes".

Valeurs trouvées par HPLC pour l'Aubépine en % drogue sèche :

	Vitexine 2" O Rhamnoside	Vitexine	Rutine	Hyperoside	Somme	Autres Flavonoïdes
.eurs + Feuilles	0,53	0,02	0,17	0,28	1	0,87
Fleurs	0,21	0,014	0,16	0,69	1,07	1,41
Feuilles	0,55	0,03	0,29	0,19	1,06	0,69

	Teneur totale en Flavonoïdes (HPLC)	Teneur totale en Flavonoïdes (DAB_8)
'leurs + Feuilles	1,87	1,00
Fleurs	2,48	1,50
Feuilles	1,75	1,15

Spectre Ultra-Violet λ max (nm)

MeOH	256*	270	342		
MeoH + NaOAc	278	330*	399		
meoH + H_3BO_3	267	366	440*		
MeoH + $AlCl_3$	276	304*	340*	425	
MeoH + $AlCl_3$/HCl	263*	277	299	355	391

L'hydrolyse par l'acide acétique donne Rhamnose et Iso-Orientine.

DOSAGE DES FLAVONOIDES TOTAUX DE L'AUBEPINE

1- Dosage des Flavonoïdes par HPLC (66)

Le dosage colorimétrique à 425 nm en présence de $AlCl_3$ des flavonoïdes proposé par le DAB_8 (18) n'est pas satisfaisant car il ne dose que les O. Hétérosides, les C. Hétérosides n'étant pas hydrolysés et peu solubles dans l'acétate d'éthyle. De plus, ces derniers forment avec $AlCl_3$ des complexes dont le maximum d'absorption se situe entre 350 et 386 nm.

Wagner (66) propose donc un dosage des flavonoïdes par HPLC :

. Solution à examiner : 500 mg de drogue pulverisée est chauffee à reflux 30 minutes avec 50 ml de méthanol. Après refroidissement et filtration, on réduit à 2 ml, puis ajoute 5 ml d'une solution standard servant d'étalon interne (5 mg/10 ml Methanol de Quercitroside).

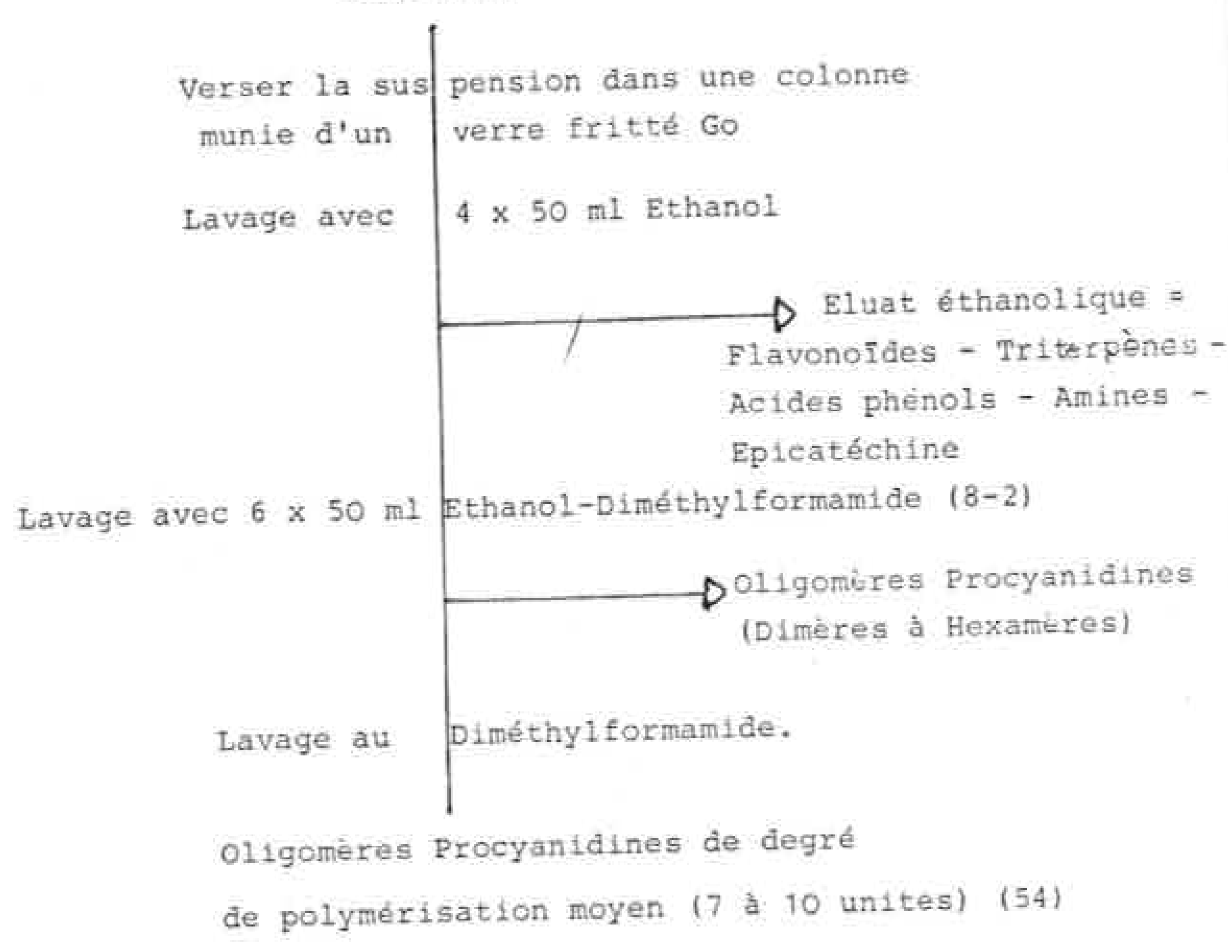
Solution étalon = 2 mg Vitexine + 4 mg de 2"O Rhamnoside Vitexine + 4 mg Rutine + 4 mg Hypéroside + 4 mg Quercitroside/ 50 ml Méthanol.

. Système HPLC de Séparation.

Colonne Bandapack C_{18} (300 x 4 mm)

Détection par spectrophotomètre à 340 nm.

Eluant = Acétonitrile - Eau - Acide Acétique (180 - 820 - 10) à la vitesse de 1 ml/mn puis après 18 minutes 2,5 ml/mn.



Les deux fractions de Procyanidines sont concentrées à sec sous-vide, reprises par du n. propanol.

B- ETUDE DES PROCYANIDINES

1- Etude par chromatographie sur couche mince

a- Evaluation du degré de polymérisation des composés polyphénoliques d'un extrait (13) total

Support = Papier Whattman n° 1 voie ascendante

Eluant	= Butanol	4	phase organique
	= Acide Acétique	1	
	= Eau	5	

Révélation : vanilline chlorhydrique diluée.

2- Etude après isolement (60)

Les fractions contenant les proanthocyanines sont éluées sur Séphadex LH-20 dans l'éthanol ou éthanol-propanol (1-1). Il est parfois nécessaire de recommencer l'opération pour séparer les produits en faisant varier les proportions éthanol-propanol. On elue d'abord les dimères B_2— B_1 puis B_3, B_4 puis les oligomères C, D.

Purification finale : la filtration sur colonne de gel de Séphadex LH-20 dans l'acetone conduit à l'obtention de produits solides identifiés par leur pouvoir rotatoire, comportement chromatographique, spectre RMN et spectre de masse du produit acétylé (anhydrique acétique/Pyridine) (60).

C PROCYANIDINES IDENTIFIEES

1- Dans l'éluat ethanolique de la colonne de Polyamide

Les dernières fractions éthanoliques contiennent :

a- (+) Catéchol (60) en faible proportion

HO OH OH OH O

Rf Kieselgel $60F_{254}$	Acétate d'éthyle	100	Rf = 0,9
	Acide Acétique	20	
	Eau	30	

Résultat : A un Rf de 0,1 correspond un poids moléculaire de 2000, un Rf de 0,2 correspond à un poids moléculaire moyen de l'ordre de 1500 ; des Rf de 0,3 à 0,4 correspondent à des poids moléculaires moyens de 1300 à 1000.

b- Chromatographie des oligomères de Procyanidines de faible degré de polymérisation (34)

Support = Couche mince de Kieselgel 6OF$_{254}$

Eluant = Acetate d'éthyle 100)
Acide Acétique 20) Phase supérieure
Eau 30)

Révélation - Extinction de Fluorescence
- Pulvérisation de Vanilline - Acide phosphorique (1 g de Vanilline/100 g d'acide phosphorique à 50 %) puis chauffage : apparition de tâches rouges intenses.

Résultat : : Les procyanidines ayant le plus faible poids moléculaire migrent le plus haut.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

Concentration importante

1 = Procyanidine B_1
2 = Procyanidine B_2
3 = Procyanidine B_3
4 = Procyanidine B_4

Chromatographie sur Kieselgel 6OF$_{254}$des oligomères Procyanidines de faible degré de polymérisation.

Revelation : Solution à 1% dans le méthanol de diphényl borate d'aminoéthanol et observation aux UV 365 nm → fluorescence brune (34).

Rf Papier Whattman n° 2 Acide Acétique 6 % = 0,47

Point de fusion = 177°

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_{578}$ = 17,8 (c = 2,0 EtOH)

b- <u>(-) épicatéchine</u> (60) en proportion importante

Rf Papier Whattman n° 2 Acide Acetique 6% = 0,37

Point de fusion = 240 - 242° (Eau)

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_{578}$ = - 57°,6 (c = 2,1 Me_2Co)

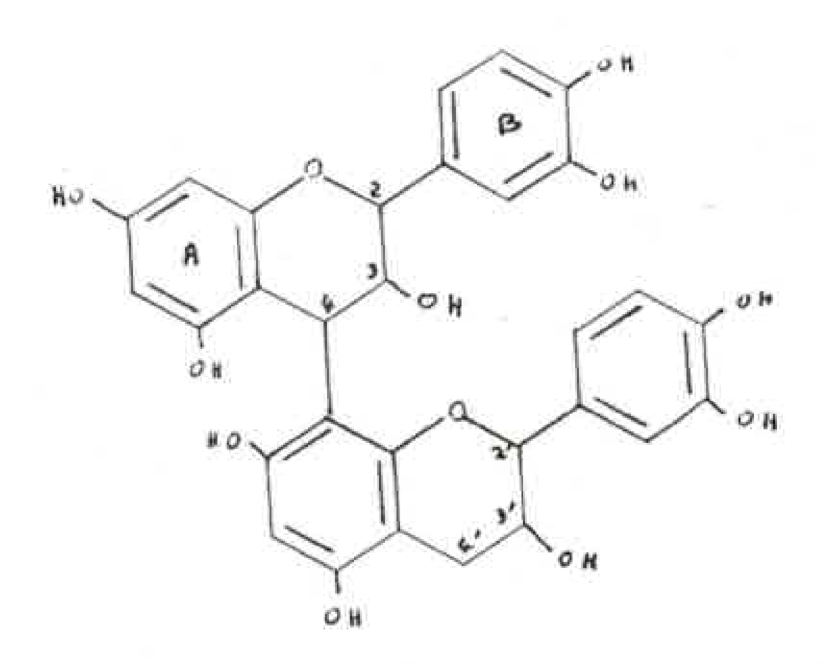
2- Dans l'éluat Ethanol-Diméthylformamide (8:2) de la colonne de polyamide

a- Procyanidines B_1-B_2-B_3-B_4-B_5 (34) (60) dimériques

	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5
Formule	$C_{30}H_{26}O_{12}$ (-) Epicatechine (+) Catechine	$C_{30}H_{26}O_{12}$ (-) Epicatechine (-) Epicatéchine	$C_{30}H_{26}O_{12}$ (+) Catéchol (+) Catéchine	$C_{30}H_{26}O_{12}$ (+) Catechol (-) Epicatéchine	$C_{30}H_{26}O_{12}H_2O$ (-) Epicatéchine (-) Epicatéchine
Rf Papier Whattman n° 2 Acide Acetique 6%	0,51	0,58	0,43	0,50	0,38
Rf ds butane 2 ol. Acide Acétique Eau (14-1-5)	0,30	0,42	0,34	0,40	0,43
Pouvoir rotatoire $(\alpha)_{578}$	+ 31° c = 0,8 EtOH	+ 15,2 c = 1,2 EtOH	- 244,7° c = 2,0 EtOH	- 193,5 c = 1,0 EtOH	+ 119,2 c = 1,35 MeOH
Produits du chauffage avec HCl/5N dans EtOH 20 minutes à 60°	Cyanidine (+) Catéchine	Cyanidine + (-) Epicatéchine	Cyanidine + (+) Catéchol	Cyanidine (-) Epicatéchine	Cyanidine (-) Epicatéchine
Importance	Quantité notable	Quantité notable	Quantité notable	Quantité notable	Quantité notable

Spectre HRMN des dimères 220MH$_2$: valeur de déplacement T, J en H2 dans $(CD3)_2$ CO (60) :

ArOH	ArH Cycle A	ArH Cycle B	OH	2-H	3-H	4-H	2'-H	3'-H	4'-H$_2$
1,5-2,5 (m)	3,9-4,1 (m)	2,8-3,4 (m)	6,2-6,5 (m)	5,20 (5)	5,65br (s)	5,90 (s)	4,95 (d) J8	4,80 (m)	7,0-7,3 (m)
1,5-2,2 (m)	3,85br (s)	2,7 - 3,15 (m)	5,95br(s)-6,18	5,13 (s)	5,55 (s)	5,89 (s)	4,75 (s)	4,90br (s)	7,0 (dd), 7,14 d J=3 et 14
1,5-2,5 (m)	2,65	- 4,2 (m)	5,9-6,2 (m)	5,27 (d) J=8	5,45-5,71 (m)	5,65 (d) J=9,5	5,42 (d) J=3,5	5,90 (m)	6,8-7,4 (m)
1,4-2,6 (m)	2,6	- 4,15 (m)	5,9-6,3 (m)	5,20 (d) J=8	5,32 (m)	5,45 (d) J=10	4,91 (d)	5,67br (s)	6,98-7,30 (m)
1,5-2,3 (m)	3,90br (s)	1,95-3,30 (m)	6,15br (s)-6,35	5,19 (s)	5,80br (s)	5,90 (s)	5,05 (s)	5,36br (s)	7,2-7,4 (m)



avec HCl 5N dans l'éthanol 20 minutes à 60° (34) (60)

Procyanidine B

Cyanidine (Rf = 0,49 sur cellulose MN300 dans solvant Forestal)

+

Catéchol

Procyanidine B_1

Procianidine B_2

Procyanidine B_3

Procianidine B_4

b- Trimère C_1 (60)

Solide amorphe coloré

$C_{45}H_{38}O_{18}2H_2O$ - (Epicatechin)$_3$

Rf Papier Whattman N°2 Acide Acétique 6% = 0,48

Le traitement par HCl 5N éthanolique donne de la cyanidine

HO
OH
OH
OH
OH
HO
OH
OH
OH
OH
HO
OH
OH
OH
OH

c- Procyanidines E et G (60)

En quantite importante ces procyanidines ont un degré de polymérisation plus éleve.

D LEUCOANTHOCYANIDINES (13) (40)

A partir d'un extrait éthanolique de feuilles d'Aubépine fractionné sur gel Sephadex LH-20, élution Méthanol-Eau (1-1) Lewak élue des leucoanthocyanidines, les plus hautement polymérisees se trouvant dans les premières fractions :

- Polymères de (-) Epicatéchine = 0,22 %
- Copolymères de leucoanthocyanidol et (-) (-) epicatéchine = 0,01 %
- Polymères de leucoanthocyanidol 004 %
- Oligomères de leucocyanidol II 0,35 %
- Oligomères de Leucoanthocyanidol I
- Dimères de Leucocyanidol = dimères de flavannes 3,4 diols
- (-) Epicatéchine.

E HEPTAHYDROXYFLAVANNE BIOSIDE (14) (15)

De la partie hydrosoluble d'un extrait de fruits et feuil de Crataegus oxyacantha est isolée une substance de nature glycosidique, soluble dans trois parties d'alcool à 30 %

Réaction d'identite :

- La solution de l'hétéroside se colore en vert avec $FeCl_3$.
- Par chauffage avec de l'alcool amylique et de l'acid chlorhydrique, il y a formation d'un colorant rouge identique à la cyanidine
- l'hydrolyse acide donne du glucose et de l'arabinose
- la scission alcaline donne de l'acide protocatéchiqu et du phloroglucinol.
- Lors du titrage potentiométrique avec une solution alcaline 0, 1N, l'hétéroside se comporte comme un phénol unibasique.
- Avec la 2, 4 dinitrophenylhydrazine on obtient une 2,4 dinitrophenylhydrazone de Point de Fusion = 107° $C_{32}H_{36}O_{20}N_4$

Le produit est identifié à un bioside de 2,3,3',4,4',5,7 Heptahydroxyflavanne.

F DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES (34)

Déposer 50 µl de fraction d'oligomères Procyanidines de faible degré de polymérisation et faire migrer parallèlement un témoin constitué de 100 µl de catéchol. Après développement dans Acétate d'éthyle-Acide Acétique - Eau (100-20-30 phase supérieure), repérer les proanthocyanidines aux UV 254 nm par leur extinction de fluorescence.

Gratter chaque zone, transférer dans un tube à essai, ajouter 4 ml de diméthylformamide 4 % aqueuse + 0,2 ml de réactif de Folin + 5 ml de solution d'ammoniaque à 25 %. Agiter.

Après 30 minutes, mesurer l'extinction de la solution claire à 700 nm (Spectrolphotometre).

Blanc = Zone vide + réactif.

$$\% \text{ Proanthocyanidines} = \frac{Ep \times 100}{E_t} \times \frac{2}{0{,}05} \times \frac{100}{2} \times 10^{-6}$$

Ep = Extinction de la solution essai

E_t = Extinction de la solution témoin.

III ACIDES PHENOLIQUES (25)

La mise en évidence des acides phénoliques de l'Aubépine nécessite un enrichissement car ils sont mêlés à des flavonoïdes.

A EXTRACTION DES ACIDES PHENOLIQUES (25)

20 g de Fleurs d'Aubépine

Dégraissage au Soxhlet à l'Ether de Pétrole

→ Extrait Ether de Pétrole
→ Fleurs

Extraction à chaud au Méthanol

→ Extrait Méthanolique
→ Résidu

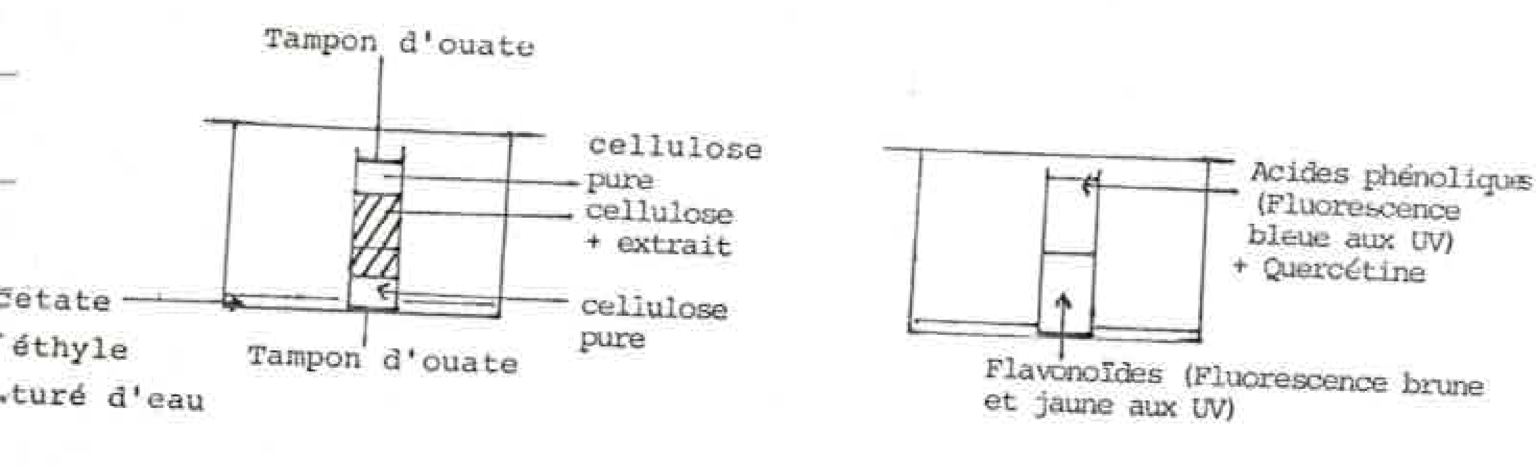
Concentration sous-vide

→ Résidu sec

Reprise par quelques ml d'Eau

Filtration

→ Insoluble (Triterpènes)
→ Filtrat mélangé à 4 - 5 g de poudre de cellulose n° 1



Après avoir séparé la partie de poudre de cellulose enrichie en acides phenoliques, évaporer l'acétate d'ethyle par séchage sous-vide et éluer les acides à l'alcool.

On filtre, concentre et soumet à un examen chromatographique.

B MISE EN EVIDENCE DES ACIDES PHENOLIQUES

Méthode = chromatographie ascendante sur papier en présence de témoins.

Révélation : Fluorescence bleue aux UV.

Après pulvérisation de $AlCl_3$ 1% alcoolique, fluorescence bleue intense aux UV.

Deux acides phénoliques sont ainsi révélés.

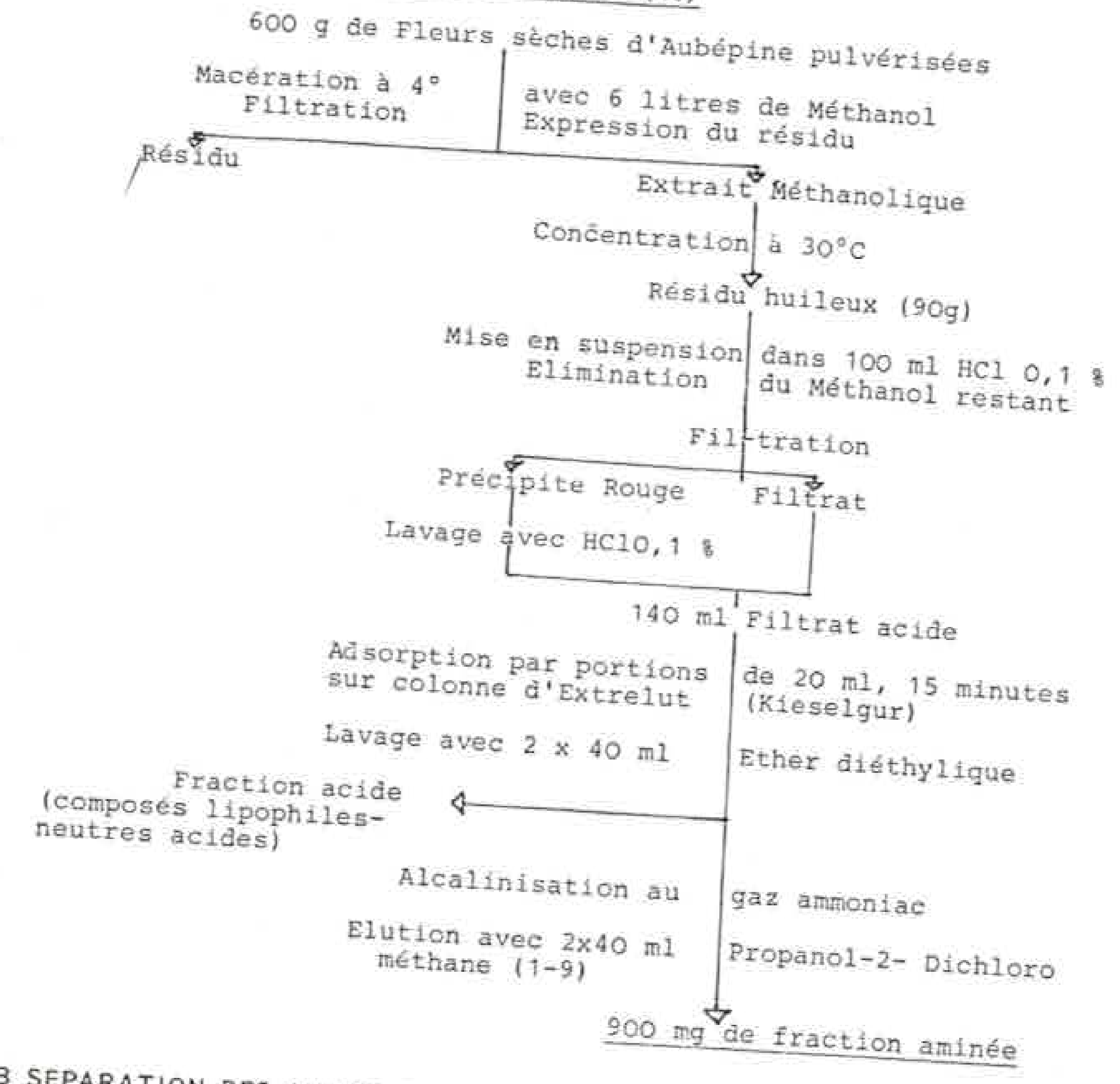
Acide chlorogénique

Acide caféique

Eluants	Rf Acide chlorogénique	Rf Acide caféique
Acétate d'éthyle/ Acide Formique Eau (15-1-5)	0,45-0,55	0,85-0,95
Phénol/Eau (1-1) Phase supérieure	0,80-0,90	0,45-0,60

IV BASES AMINEES DE L'AUBEPINE

A ISOLEMENT DE LA FRACTION AMINE (65)



B SEPARATION DES AMINES ENTRE ELLES (65)

Méthode = HPLC préparative de paire d'ion.

Colonne = µ Bondapak C_{18} (7,9 x 300 mm)

Eluant = H_2O-MeOH (70-30) + PICB7 (5mM de sel de sodium de l'acide heptanesulfonique et 15 mM d'acide acétique), parfois H_2O-MeOH (50-50)

Vitesse de l'éluant = 4 ml/mn

Détection : Spectrophotomètre aux UV 280 nm

Conduite de la séparation : injection de 10 mg de fraction aminée en solution à 1% dans l'éluant. La clarification se fait par filtration à travers une membrane.

Résultat : obtention de 5 fractions ; chaque fraction est concentrée à sec, reprise par 20 ml HCl 0,1 % et portée sur colonne d'extrelut pour éliminer le PICB7. Après 15 minutes d'adsorption sur la colonne, on fait passer du gaz ammoniac jusqu'à réaction alcaline de la phase aqueuse immobilisée. Les composés basiques sont elués avec 2x40 ml de Propanol 2-Dichloromethane (1-9).

C IDENTIFICATION DES AMINES (55) (65)

Methode = Chromatographie sur couche mince de Kieselgel 60F254

Eluant = Ether éthylique	17
Méthanol	2
Ammoniaque 25 %	1

Détection : Pulvérisation de Fluorescenine à 0,02 % dans l'acétone puis observation aux UV 360 nm.

Amines Primaires : Tâches bleu marine

Amines Secondaires : Tâches violet sombre

Amines Tertiaires : Ne réagissent pas. On ne les visualise que par pulvérisation de réactif au iodoplatine. A la lumière du jour apparaîssent des tâches brunes.

Richardson (55) à partir d'un distillat de fleurs d'Aubépine opère la chromatographie sur papier Whattman 3MM préalablement lavé 30 minutes avec HCl 1N et rincé deux à trois heures avec de l'eau distillée dans le BAW

n Butanol	4	
Acide Acétique	1	voie ascendante
Eau	5	

Sont ainsi identifiées :

1- Amines volatiles

Isoamylamine (55)

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} > CH-CH_2-CH_2-NH_2$$ Rf BAW = 0,70

Isobutylamine (55)

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} > CH-CH_2-NH_2$$ Rf BAW = 0,59

Triméthylamine (55) (65)

$$CH_3-\overset{CH_3}{\underset{CH_2}{C}}-NH_2$$ Rf BAW = 0,31

β Phenyléthylamine (55) (65)

$C_6H_5-CH_2-CH_2-NH_2$ Rf BAW = 0,74

Spectre de masse m/c

121 (M^+ 2%)
92 (5%)
91 (7%)
30 (100%)

O Méthoxy β - Phényléthylamine (65)

$o-CH_3O-C_6H_4-CH_2-CH_2-NH_2$

Spectre de masse m/e	151 (M^+, 2%)
	147 (15%)
	122 (70 %)
	30 (100%)

Tyramine (65)

HO — C_6H_4 — CH_2 — CH_2 — NH_2

Spectre de masse m/e	137 (M^+, 10%)
	108 (70%)
	107 (50%)
	30 (100%)

Le dosage spectrophotométrique des amines volatiles au 1 fluoro, 2, 4 dinitrobenzène montre qu'elles ne sont pas détectées tant que les fleurs de l'inflorescence ne commencent pas à s'ouvrir . Le taux maximal 70-90 µg exprimé en iso-amylamine (/g de poids frais) est atteint quand presque toutes les fleurs de l'inflorescence sont ouvertes, puis leur concentration tombe rapidement (55).

2- Bases puriques (38)

Des aminopurines ont eté mises en évidence.

Méthode = chromatographie sur papier Whatman N°1

Matériel = Fraction purique obtenue par précipitations spécifiques d'un extrait aqueux de fleurs ou feuilles d'Aubépine.

En parallèle sont chromatographiés des témoins.

Eluant =	Butanol	50
	Eau	35
	Ethanol	15

Révélation : Par photographie du chromatogramme en lumière UV filtrée à 260 nm sur papier Agfa-Cépase, les dérivés puriques donnent des tâches blanches sur fond noir.

Adénine

Rf = 0,56

Adénosine Rf = 0,44

Guanine

Rf = 0,35

Acide Urique Rf ≡ 0,10

Des fleurs de l'Aubépine a également été extraite une substance extinctrice de fluorescence et identifiée à la N, N', N" Tricoumaroyl Spermidène.
Rendement = 0,04 % (36)

3- Amines Tertiaires (24)

Extrait aqueux de feuilles d'Aubépine préparé à chaud

Concentration sous-vide 40-50°
Agitation avec MgO - Pb $(OH)_2$
+ Acetone - Alcool (1-1) en excès
Filtration

→ Flavonoïdes-Tanins Mucilages

→ Filtrat

+ Acétate de Plomb en milieu alcalin
Filtration

→ Filtrat

→ Flavones

Ajustement à pH neutre
Evaporation des solvants organiques

→ Solution aqueuse

+ Alcool - Acétone (1-1)
Filtration

→ Filtrat

→ Sels organiques

Evaporation des solvants organiques sous-vide

→ Solution aqueuse claire

Précipitation par l'Acide Phosphotungstique

→ Precipité de sel de choline

Décomposition

→ Cristaux sous forme de plaquettes à 6 faces de choline (Recristallisation Acétone-Eau)

→ Acétylcholine en solution

Caracterisation de la choline

$(HOCH_2-CH_2-N(CH_3)_3)^+ \quad OH^-$

- Par l'aspect caractéristique des cristaux
- Par chromatographie sur papier, voie ascendante dans Butanol-Acide Acétique-Eau (4-1-5). Phase supérieure.

  Révélation par le réactif de Dragendorff ou le réactif de Staneck (solution iodo-iodurée de potassium diluée au 1/30) : apparition d'une tâche brune palissant rapidement.

Caracterisation de l'Acétylcholine :

$$CH_3-COO-CH_2-CH_2-\overset{+}{\underset{OH^-}{N}} \equiv (CH_3)_3$$

Le filtrat de décomposition de la choline, concentré à 30° est chromatographié sur papier.

Eluant = n Butanol saturé d'eau.

Révélation : Par pulvérisation de $FeCl_3$, apparition d'une tâche violette d'acide acétylhydroxamique.

V TERPENOIDES DE L'AUBEPINE

A MISE EN EVIDENCE CHROMATOGRAPHIQUE (18)

Méthode = Chromatographie en couche mince sur Kieselgel d'un extrait méthanolique de sommités fleuries d'Aubépine.

Eluant = Acétate d'éthyle 100
Méthanol 20
Eau 10

Révélation = Pulvérisation de la plaque par de la vanilline sulfurique puis chauffage de 5 minutes à 105°

Les stérols et triterpènes apparaissent aux Rf 0,75 à 1,00.

B SESQUITERPENES (17)

Des sesquiterpènes, composés normaux de la partie lourde des huiles essentielles ont été détectés dans les sommités fleuries d'Aubépine traitées selon la méthode de Stahl par chromatographie sur Silicagel GF 25.

Révélation : Vanilline sulfurique puis chauffage 5 minutes à 105-110°.

Eluants		Rfx100Bisabolo-xoride	Rfx100Bisabolol	Rfx100Farnésène
Benzène Acétate d'Ethyle	95-5	21,4	34,1	93,4
Chloroforme-Benzène	75-25	22,2	34,1	92,7
n Hexane-Acétate d'éthyle	96-4	9,87	78,7	91,1

L & Bisabolol

$(CH_3)_2C = CH - CH_2 - C(OH)(CH_3) - C_6H_4 - CH_3$

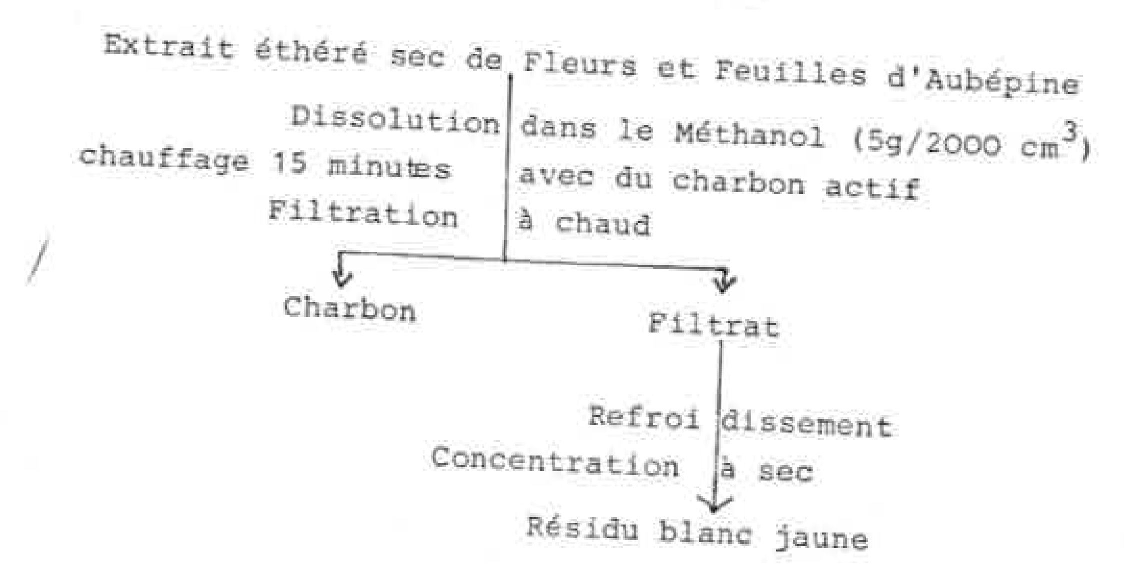
Farnesène $C_{15}H_{24}$

C TRITERPENES PENTACYCLIQUES (62)

Bächler avait isolé des fruits de Crataegus une substance qu'il appelle acide crataegique. Puis Diether identifie dans cette substance des fonctions lactones et la nomme Crataegus-lactone (22) (51).

Cette même crataeguslactone a été isolée ensuite des fleurs et des feuilles d'Aubépine et identifiée à un mélange d'acides triterpéniques.

1- Extraction des triterpènes pentacycliques (62)



Le résidu est méthylé au diazométhane, l'excès éliminé par HCl dilué. La solution éthérée après lavage avec NaOH 2N puis l'eau donne, après évaporation, une croûte incolore.

La croûte est dissoute dans le benzène et chromatographiée sur colonne d'oxyde d'aluminium avec pour éluants :

Benzène

Benzène - chloroforme : (8-1) à (1-1)

Chloroforme

Chloroforme + 1% Méthanol

Des fractions de 150 cm^3 sont collectées, celles réunissant les mêmes constituants rassemblées.

2- Triterpènes pentacycliques identifiés (62)

a- Acide Ursolique

Dans les fractions éluées Benzène-$CHCl_3$ (9-1) se trouve l'ester méthylique de l'acide ursolique (PF = 169°)

b- Acide Crataegolique

Dans les fractions éluées Chloroforme – Chloroforme + 1% Méthanol se trouve l'ester méthylique de l'Acide Crataegolique qui après recristallisation a un Point de Fusion de 217-219°.

$C_{30}H_{48}O_4$ = Acide 2,9 Dioxy $\Delta^{13,18}$ ursan carbonique

Pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20}$ = 18° (c = 0,667 $CHCl_3$)

e- Acide oléanolique

Il avait ete identifié par Bersin (62)

COOH

HO

VI ESSAIS

Perte à la dessication (9)

Déterminée sur 1,00 g de drogue, la perte à la dessication ne doit pas être supérieure à 10 pour cent.

Cendres totales (9)

Déterminé sur 1,00 g de drogue, le taux des cendres totales ne doit pas être supérieur à 6 pour cent.

Cendres sulfuriques (18)

Determiné sur 1,00 g de drogue, le taux des cendres sulfuriques ne doit pas être supérieur à 12 pour cent.

Réactions d'identité (1)

Solution à examiner : Préparer une teinture au 1/5 par macération dans l'alcool à 60°. Introduire dans une ampoule à décantation 25 ml de teinture, ajouter 20 ml d'eau. Epuiser par 25 ml d'acétate d'éthyle, evaporer cette solution au bain-marie et reprendre le résidu par 5 ml d'acétate d'éthyle.

A. A 1 ml de solution à examiner, ajouter 10 ml de chloroforme, agiter. Prélever la solution chloroformique. A 1 ml de cette solution, ajouter environ 1 ml d'un mélange à parties égales de solution de trichlorure d'antimoine et d'anhydride acétique. Il se développe une coloration jaune qui vire au rouge après chauffage de 1 minute au bain-marie bouillant.

B. A 1 ml de solution chloroformique, ajouter un volume égal d'anhydride acétique, puis de l'acide sulfurique avec precaution. Il se développe une coloration violette qui passe lentement au vert.

Essai chromatographique (9)

Opérer par chromatographie couche mince, en utilisant une plaque de gel de silice GR

a) solution à examiner

100 g de drogue pulvérisée (710) est epuisé par 10 ml de méthanol R sous agitation au bain-marie à 60°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, filtrer. Le filtrat servira de solution essai.

b) solution témoin

Dissoudre 2 mg d'acide chlorogénique R, 5 mg d'hypéroside R, 5 mg de Rutine R dans 10 ml de méthanol R.

Déposer sur la plaque en bande de 20 mm de long sur 3 mm de large, respectivement 5 µl de la solution témoin et 30 µl de de la solution à examiner.

Développer sur un parcours de 15 cm avec un mélange de 50 volumes d'acétate d'éthyle R, 30 volumes de methyléthylcétone, 10 volumes d'acide formique, 10 volumes d'eau. Laisser sécher la plaque à l'air pendant quelques minutes. Pulvériser sur la plaque une solution à 1% dans du méthanol de diphénylborate d'aminoethanol R (10 ml pour une plaque de 20 x 20 cm). Après séchage de la plaque à l'air, observer en lumière ultra-violette à 365 nm.

La tâche de fluorescence jaune-verte, dont le Rf est le plus faible sur le chromatogramme de la solution à examiner, correspondant au vitexine 2"O Rhamnoside, est sensiblement à la même hauteur que la tâche de fluorescence orangée de la rutine sur le chromatogramme de la solution témoin.

A un Rf supérieur on reconnaît sur les deux chromatogrammes, la fluorescence bleutée de l'acide chlorogénique, puis celle de fluorescence brun-jaune à orangé de l'hypéroside. Directement au dessus de la tâche de l'hypéroside, sur le même chromatogramme de la solution à examiner, se trouve une tâche de même fluorescence. Près du front du solvant, on remarque une tâche de fluorescence bleutée. D'autres tâches de fluorescence plus faible (jaune-vert) se rencontrent sur le chromatogramme de la solution à examiner.

Mais il ne devra pas y avoir, sur le chromatogramme de la solution à examiner, de tâche de fluorescence bleu-vert directement sous la tâche de fluorescence bleutée près du front du solvant, ni de tâche de fluorescence jaune-vert entre la vitexine 2"O Rhamnoside et l'acide chlorogénique (falsification par Prunus Spinosa).

Un autre essai chromatographique peut être réalisé sur Kieselgel en déposant 30 µl de solution témoin que l'on développe dans :

Acétate d'éthyle	100
Méthanol	20
Eau	10

Après séchage de la plaque à l'air, la pulvérisation de vanilline sulfurique montre la présence de stérols et triterpènes aux Rf 0,75 à 1,00. (18)

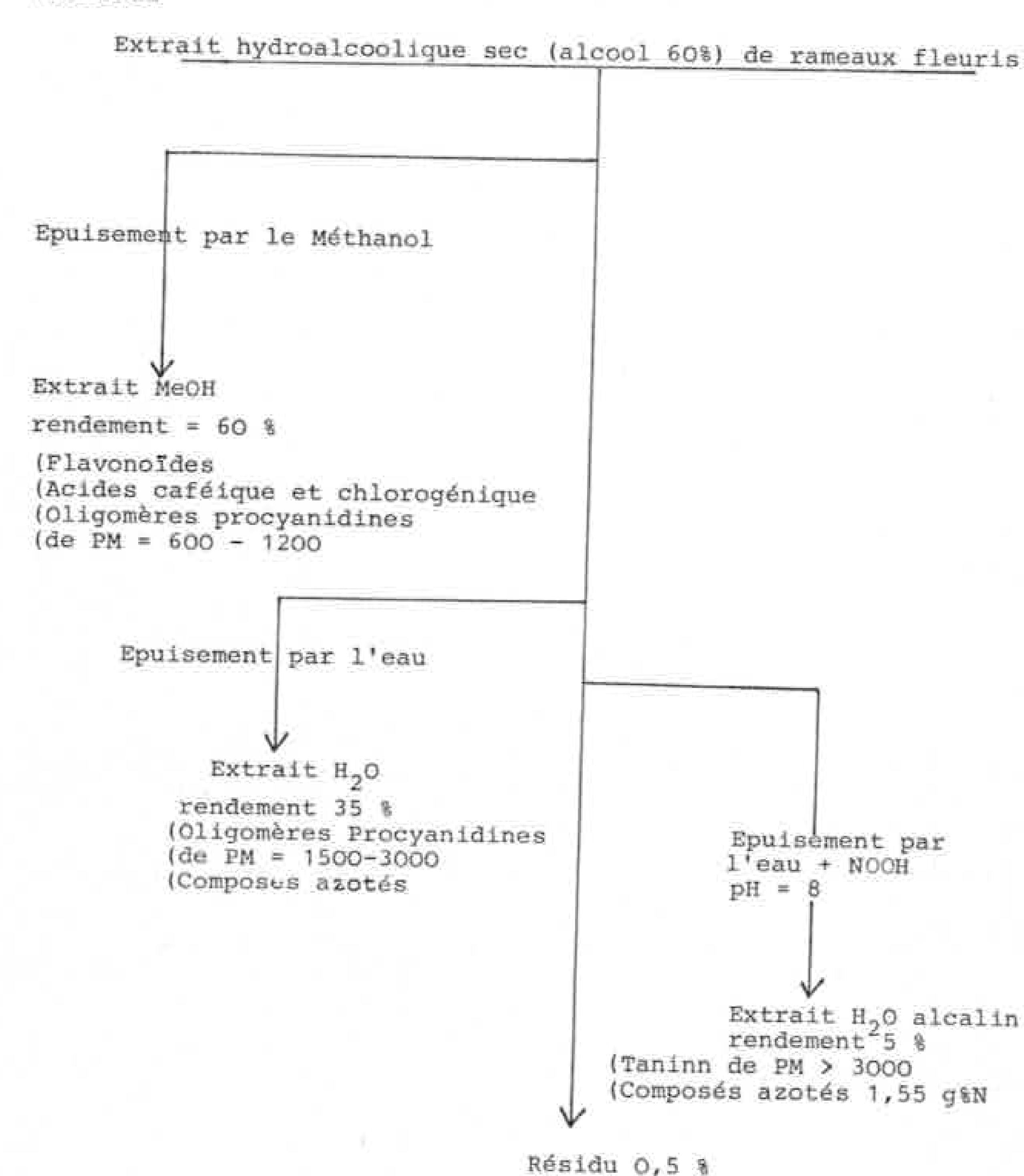
C H A P I T R E   I I I

E T U D E   P H A R M A C O L O G I Q U E

I ACTION DE L'AUBEPINE SUR LES VAISSEAUX

A ACTIVITE SPASMOLYTIQUE (12)(13)

Matériel



Absence dans tous les extraits de triterpènes, dérivés puriques, catéchine.

Méthodes d'étude d'une activité spasmolytique de l'aubépine

Etude in vitro de la relaxation du muscle vasculaire lisse ; l'aorte isolée de rat, privée de l'adventice (complexe vasculo-nerveux) découpée en spirale et montée dans une cuve à organe (liquid de Krebs + Carbogène) avec une tension de base de 1 g.

On enregistre les contractions selon deux méthodes :

Méthode I : Les substances étudiées sont ajoutées 20 minutes avant que l'on fasse contracter l'aorte par une dose de plényléphrine avec contraction témoin sans inhibiteur avant et apres chaque essai.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Intensité de la contraction en presence de la substance active}}{\text{Intensité de la contraction temoin}}$$

Résultat de l'inhibition de la contraction de l'aorte isolée de rat

Substance	Inhibition de la contraction
Extrait total 2 mg/ml	41,3 % ± 5,93
Extrait MeOH 1 mg/ml	31,8 % ± 1,74
Extrait H_2O 1 mg/ml	0
5 mg/ml	0
10 mg/ml	0
Extrait H_2O alcaline 0,1 mg/ml	0

Méthode II : Au plateau de la contraction provoquée par la plényléphrine, on ajoute toutes les cinq minutes des doses croissantes du produit étudié qui entraînent à chaque fois un doublement de la dose contenue dans le bain. On note les pourcentages de décontraction pour chaque dose.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Intensité de la contraction obtenue}}{\text{Intensité de la contraction initiale}}$$

DE50 =Dose provoquant 50% d'inhibition de la réponse contractile de l'aorte.

Résultat : Inhibition de la contraction de l'aorte isolée de rat

Substances	DE_{50} en mg/ml
Extrait total	7,0 ± 2,14
Extrait MeOH	3,13 ± 0,94
Extrait H_2O	Pas d'activité jusqu'à 10 mg/ml

Conclusion : L'extrait total et l'extrait méthanolique d'Aubépine possèdent une activite spasmolytique directe sur le muscle vasculaire lisse.
Les flavonoîdes sont en partie responsables de l'action vasodilatatrice de l'Aubépine par interaction directe avec le muscle lisse.

B ACTION CORONORODILATATRICE

Définitions préliminaires :

Esbericard* = Extrait aqueux de Fleurs-Feuilles et fruits d'Aubépiné (dépourvu d'acides triterpéniques) (33)

Crataegutt* = Extrait alcoolique (alcool 45°) de feuilles et fleurs d'Aubépine (6)

Crataemon* = Extrait flavonique pur de feuilles de Crataegus monogyna (31)

Phlobaphènes de Hahn (32) = Précipité brun rouge obtenu par ébullition 30° minutes à 95°C d'un décocte aqueux de fleurs et feuilles d'Aubépine avec une quantité égale d'acide chlorhydrique concentré au-demi.

1- Mise en évidence in vitro d'une activité coronaro-dilatatrice

Méthode (61) : Le coeur isolé de cobaye selon la méthode de Langendorff est irrigué par une solution de Tyrode oxygénée et récuperée dans un Stromuhr dont on enregistre les impulsions sur un hymographe recouvert de suie.

A la sortie de la solution de Tyrode est fixé un tuyau penchant dans l'aorte et permettant l'injection des extraits D'Aubépine à tester.

Le nombre d'impulsions permet alors d'évaluer les variations du débit coronaire.

Résultat : Activités des extraits d'Aubépine sur le débit coronaire.

Voir tableau page suivante.

Extrait	Quantité	Durée de l'injection	Variation du débit coronaire	
			% de Variation	Durée d'Action
Esbericard* (32)	0,1 ml		Augmentation atteignant son maximum en 9 minutes	50 minutes
Extrait aqueux (64)	524 g/ 0,5 ml	3 minutes	Augmentation de 80%	21 minutes
Crataegutt (57)	0,15 ml	4 minutes	Augmentation de 50-100%	60 à 120 minutes
Crataegutt (61)	0,15 ml	4,5 minutes	Augmentation de 140% en 10 secondes	60 minutes
l'Epicatéchine (57)	0,3 ml	2 minutes	Augmentation de 50%	70 minutes
Phlobaphènes (32)	0,05 ml		Augmentation rapide de même intensité que 0,1 ml d'Esbericard	
Heptahydroxyflavanbioside (14)	10^{-4}		Augmentation	

<u>Conclusion</u> : In vitro, l'Aubépine (extraits aqueux, alcoolique, et constituants) possèdent une action coronaro-dilatatrice.

Selon la même méthode du coeur isolé de cobaye a été étudiée l'interaction de l'Aubépine (extrait aqueux) avec d'autres substances coronaro dilatatrices. On estime le débit coronaire avec ces coronarodilatateurs puis sa variation après application de l'extrait (10 tests chaque fois) (32)

Substance coronarodilatatrice	Variation en % du débit coronaire apres 0,1 ml Esbericard
0,5 mg Théophylline	+ 14,5 %
0,01 mg Papavérine	+ 19,1 %
1,0 mg caféine	+ 20,7 %
0,0005 mg adénosine	- 5,9 %
0,5 mg Nitrite de Sodium	- 10,1 %
0,0005 mg adrénaline	- 6,8 %

2- Mise en evidence in vivo d'une activité coronarodilatatrice

a- Sur l'animal narcosé

Méthode (33) : Estimation du débit coronaire chez l'animal narcosé et soumis à la respiration artificielle à l'aide d'un thermostromuhr.

Extrait	Animal	Dose et Voie	Variation de débit coronaire	
			% de Variation	Duree
Esbericard (33)	Chien	2 cm^3 IV en 4'	↗ 35% avec relation dose-effet	20-25'
Esbericard (32)	Chien	0,2 ml/kg IV	↗ dépendante de la dose	Durable
Phlobaphènes (32)	Chien	1,6 ml/kg IV	↗ 25 - 50 %	20'

↓
vitexine 2 rhamnoside ?
hyperoside ?

Lors d'injection intra-coronaire d'extrait alcoolique d'Aubépine, on met en évidence des augmentations importantes de débit coronaire, jusqu'à 270 % avec 0,05 ml/kg mais se maintenant 600 secondes, ces resultats trop courts ne peuvent intéresser la thérapeutique (7)

b- Sur l'animal vigile (44) (56)

Méthode : Mesure de variation du débit coronaire dans le muscle du ventricule gauche chez le chien non anesthésié grâce à deux sondes à conduction de chaleur. Les deux extrémités en or implantées dans la paroi du ventricule gauche vers la branche descendante de l'artère coronaire gauche peuvent être chauffées alternativement en courant continu. Les mesures de température sont faites en sous-cutané sur le dos de l'animal grâce à un fluviographe.

On mesure ainsi l'irrigation locale des tissus en enregistrant la différence de température entre un point chauffé et un point non chauffé connaissant la relation.

$$\lambda = \frac{K \cdot I^2}{\delta}$$

λ = Elévation de température

I = Intensité au courant

δ = Différence de température en °C

K = Constante en cal/cm sec °C estimée par étalonnage avec 10 % de gélatine et $\lambda = 12,5 . 10^{-4}$ cal/cm sec°C.

La variation $\Delta\lambda$ est en relation avec les modifications d'irrigation des tissus.

Après avoir observé durant 10 jours les variations spontanées de l'irrigation myocardique (chute vers 13h et 15h ou 14h et 16h), les chiens reçoivent le médicament 3 fois par jour, mélangé à leur nourriture à 10, 12 et 14 heures.
On mesure alors la variation de l'élévation de la température dans la journée par rapport à la valeur matinale de repos (entre 8h30 et 10h).

Extrait	Dose	Δλ cal/cm sec°C	Variation du débit coronaire	Durée
Esbericard (44)	3x0,5-1,4g	10h30 : 0,3 $x10^{-4}$ 15h : 0,46$x10^{-4}$	↗ 25% ↗ 39%	>1h,5
	3x1,5-2,4g	10h30 : 0,3 $x10^{-4}$ 15h : 0,34$x10^{-4}$	↗ 25% ↗ 28%	>1h,5
	3x0,5-1,4g (30 jours)	Repos : 1,2 $x10^{-4}$	↗ 120% (tendance vers un maximum)	
Dipyridamol (44)	Dose utile	Repos : 0,79$x10^{-4}$		
Oligomères Procyanidines (56)	3x15mg/kg		Faible variation	
	3x25mg/kg	Augmentation de Δλ après la première dose	↗	ne se maintient pas
	3x35mg/kg	15h: 0,65$x10^{-4}$	↗70%	Chute après 15h.
	3x70mg/kg	15h: 0,42$x10^{-4}$	↗	Plusieurs h.
	3x0,5-1,4g	15h-0,65$x10^{-4}$	↗ 70%	
	3x30-70mg/kg 6 jours	Repos:+0,2à+0,4 10^{-4}	↗	
	18 jours	Repos:+0,5$x10^{-4}$	↗	Tendance vers maximum
	36 jours	Repos:+0,5$x10^{-4}$	↗	

Conclusion : L'aubépine possède une action coronaro-dilatatrice se manifestant in vitro mais aussi in vivo par voix orale, ce qui est important pour la thérapeutique. Les composés sont donc absorbés.

Cette amelioration de l'irrigation du myocarde est

- durable par voie orale
- dépendante de la dose

II ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA CIRCULATION SANGUINE

A ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA PRESSION ARTERIELLE

1- Action par voie parentérale chez l'animal narcosé

Méthode : Mesure de variation de la Pression artérielle de l'animal après administration d'extraits d'Aubépine.

Résultat : Influence de l'Aubépine sur la pression arterielle de l'animal narcosé par voie parentérale (voir tableau annexe 1).

Interprétation des résultats (7) : Les résultats obtenus avec les extraits aqueux d'aubépine sont variables. Avec les extraits alcooliques, il y a hypotension plus nette. Cette diminution de pression conduit à un soulagement du coeur et une baisse de ses besoins en oxygène.

Tableau annexe n° 1

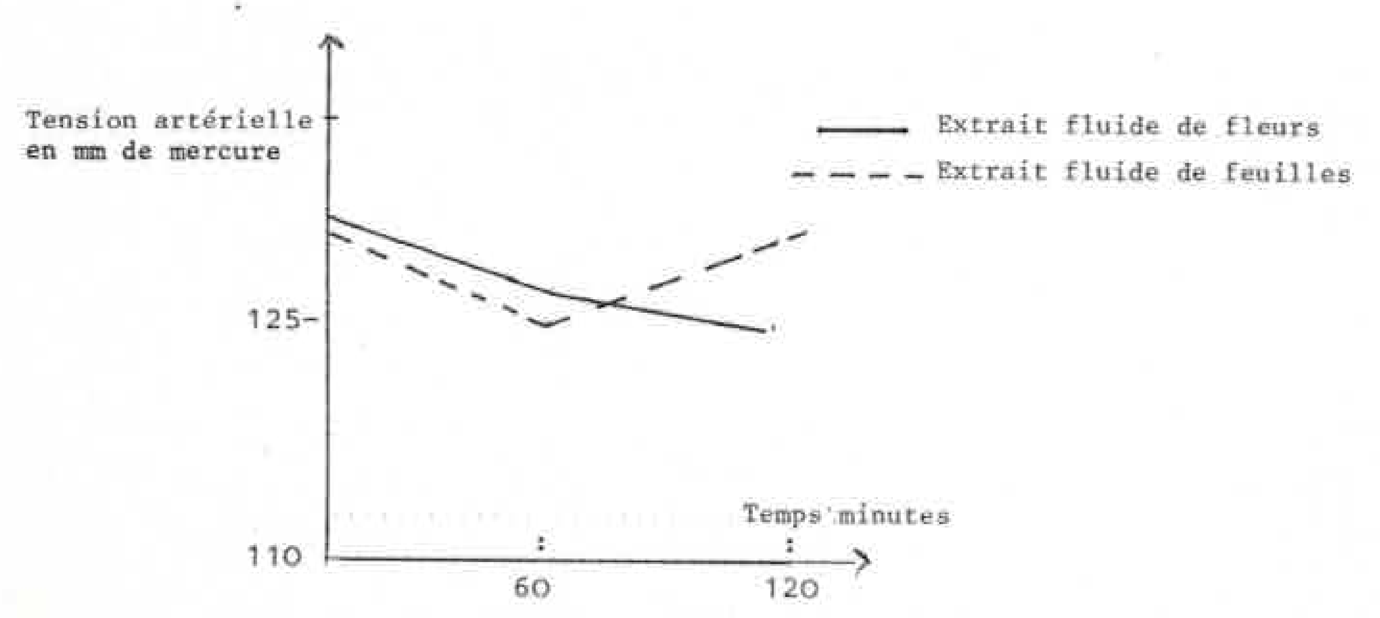
Extrait	Animal	Méthode	Dose et Voie	Variation de Pression Artérielle	
				Modification observée	Durée
Esbericard (19)	Chien narcosé	Neuhaus (artère brachiale)	1 ml IV 2 ml IA	Légère diminution Aucune variation	Fugace
Esbericard (33)	Chien narcosé	Statham élément (artère fémorale)	2cm^3 IV	40 cas : sans variation 2 cas : Diminution de 20mmHg	1 minute
Esbericard (32)	Cobaye narcosé		0,2 ml/kg IV	Légère augmentation	
Crataegutt (7)	Chien narcosé		0,3 ml/kg IV 1 ml/kg IV	Diminution de 150 à 140 mm Hg Diminution de 143 à 90 mm Hg	4-5 minutes 7-8 minutes
Teinture (alcool 60°) de Crataegus (21)	Chien narcosé	Kymographe de Ludwig (carotide)	0,5 cm^3/kg IV	Chute de 8 à 10 cm de Hg	40 secondes
Alcool 60° (21)	Chien narcosé	Kymographe de Ludwig	1 cm^3/kg IV 1 cm^3/kg IV	Chute de 8 à 10 cm de Hg Chute inconstante de 2 cm de Hg	90-120 secondes
Polymères flavoniques dimériques (53)	Chat narcosé		1 ml/kg IV 4 ml/kg IV	Diminution de 8,6 mmHg en 1à3' Diminution de 28 mm Hg	3-4 heures 3-4 heures
3',4',5,7 tétrahydroxy flavone 3,4 diol (54)	Chat narcosé	Manomètre de Ludwig (artère fémorale)	3 ml/kg IV	Diminution progressive de 27 mm Hg, plus importante si pression initiale plus élevée maximale en 90 minutes	180 minutes
Procyanidines oligomères (56)	Chat narcosé		15 ml/kg IV en 2 minutes	Diminution de 8 mm Hg en 1 minute suivie d'augmentation de 2 mmHg au dessus de la valeur initiale	9 minutes 15 minutes

2- Action par voie orale chez l'animal vigile (23)

Méthode : La tension est prise par voie non sanglante sur l'animal éveillé. Les mesures sont effectuées 60 ou 120 minutes après une administration unique ou, dans le cas d'un traitement chronique, immédiatement avant la nouvelle administration.

a- Administration unique

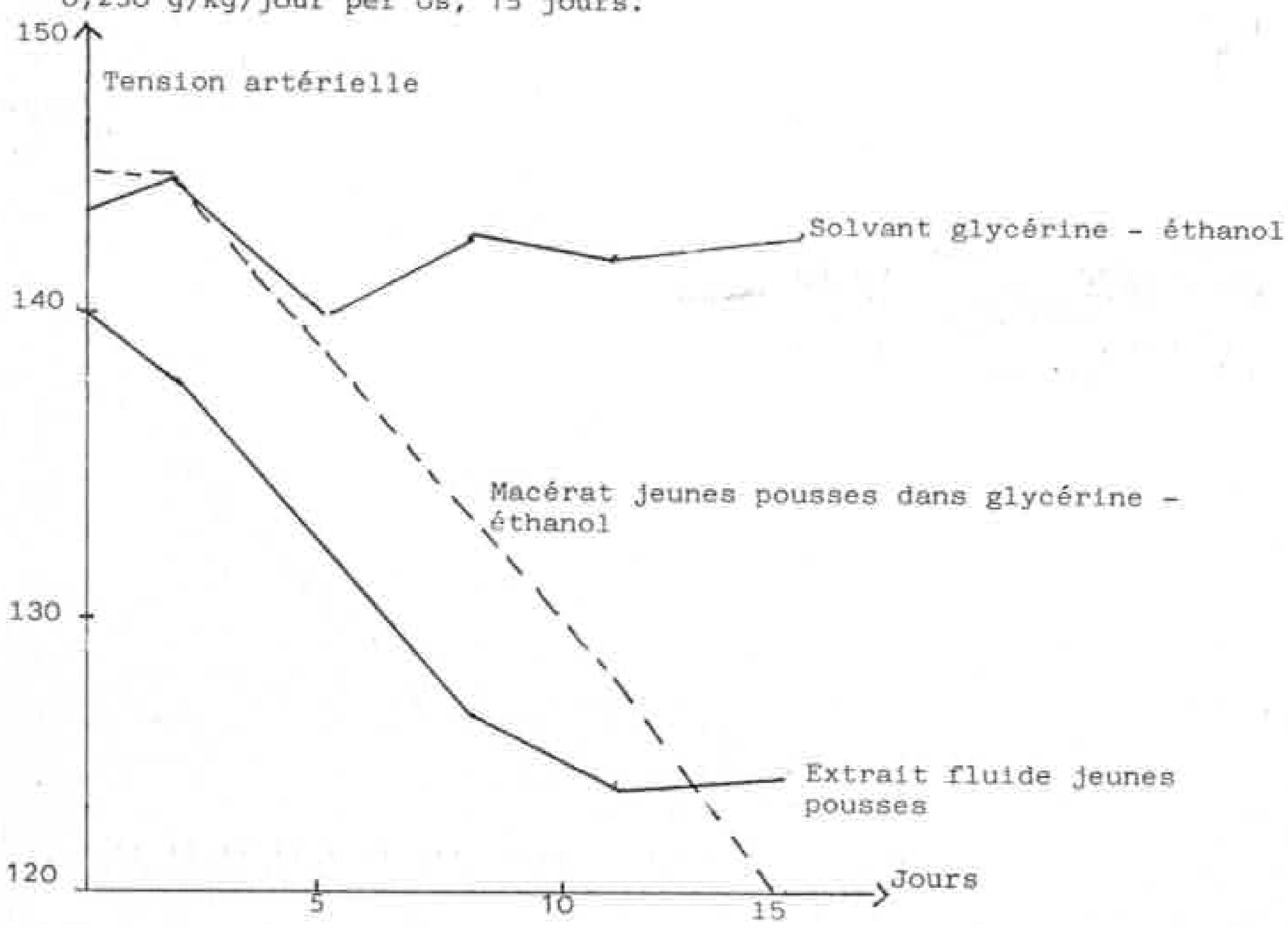
Résultat : Activité comparée de différentes préparations de crataegus oxyacantha sur la tension artérielle ; administration unique : 12,5 mg/kg per os exprimée en poids sec de plante.



Il y a baisse de la tension artérielle en 1 heure.

b- <u>Traitement réitéré</u>

Modification de la Tension artérielle par traitement réitéré 0,250 g/kg/jour per os, 15 jours.



Sur 15 jours on enregistre une baisse (10% environ). Après arrêt, la tension arterielle revient à sa valeur primitive.

B ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA CIRCULATION PERIPHERIQUE

Méthode = Mesure de la variation du débit sanguin de divers organes sous l'action d'extraits d'Aubépine.

Résultat = Variation du débit sanguin des organes sous l'influence de l'Aubépine (voir tableau annexe 2)

Interprétation du résultat : Pour Braesch (19) l'Aubépine a surtout une action périphérique. La baisse de Pression artérielle serait une conséquence de l'augmentation de l'irrigation musculaire et vasodilatation des autres vaisseaux. Une baisse des résistances périphériques a été observée (7).

Extrait	Méthode	Animal	Organe	Dose et voie	Débit sanguin	
					Variation	Durée
Esbericard (7)	Rotameter	Chien narcosé	Tête (carotide)	0,5 - 2 ml I.A	Augmentation de 109 à 145 ml/mn	
				5 ml I.V	Pas de changement	
Esbericard (33)	Manomètre de Wismart - Tauchspul	Chien narcosé	Pression artérielle (Veine fémorale)	2 cm3 I.V	Pas de modification	
Esbericard (19)	Thermostromuhr de Rein	Chien narcosé	Muscle (Artère fémorale) post-sup	0,025 - 2 ml I.V en 15 secondes	Augmentation en 1 minute de 123 sur 148 cas.	3 - 6 minutes
				2 ml I.A (30 sec.)	Augmentation en 20 - 30 sec.	1 minute
			Peau (Artère saphène)	2 ml I.V (15 sec.)	Baisse après 30 - 40 sec.	7,5 minutes
				2 ml I.A (30 sec.)	Forte baisse	2 minutes
			Rein (Artère rénale)	2 ml I.V (15 sec.)	Augmentation dépendante de la dose.	
				2 ml I.A (30 sec.)	Diminution	

III ACTION DE L'AUBEPINE SUR LE FONCTIONNEMENT CARDIAQUE

A ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA CONTRACTILITE DU MYOCARDE

Méthode : l'estimation de la contractilité du myocarde se fait par enregistrement de l'amplitude de contraction du muscle cardiaque (Hauteur de la contraction sur le mécanogramme) (32)

1. Etude in vitro

Extrait	Méthode	Dose	Amplitude contraction	
			Variation	Dur
Esbericard (32)	Coeur isolé de cobaye Langendorff	0,1 ml	Diminution fugace suivie d'une augmentation lente et continue	
Extrait aqueux d'Aubépine (64)	Coeur isolé de cobaye Langendorff	524µg/0,5 ml	Augmentation de 22 %	6 m
Crataegutt (57)	Coeur isolé de cobaye Langendorff	0,15ml en 4'	Augmentation	
Crataegutt (61)	Coeur isolé de cobaye Langendorff	0,15ml en4,5'	Augmentation	
Phlobaphènes (32)	Coeur isolé de cobaye Langendorff		Augmentation	
Polymères flavoniques dimères (53)	oreillette isolée de lapin	40 µg/ml	Augmentation de 42%	6 m

Interprétation du résultat : Toutes les expériences montrent une augmentation de l'amplitude de contraction du myocarde. Cette augmentation de contractilité traduit une action inotrope positive de la part de l'aubépine.

2. Etude in vivo

Extrait	Méthode	Animal	Dose et Voie	Contractilité
Esbericard (33)	Thermostromuhr de Rein (artère pulmonaire)	Chien anesthésié	2-4 ml IV	Faible accrois- volume par minut du coeur
Heptahydroxy Flavonbioside (14)	Pression dans l'atrium droit	Chien anesthésié	0,5-15mg/kg IV	Augmentation de volume de l'amplitude de contraction
Crataemon (7)	-	Chat anesthésié	10mg/kg IV	Augmentation de l'amplitude de contraction de 20%

In vivo comme in vitro, l'aubépine possède une action inotrope positive. Mais selon Wagner (65) l'effet inotrope positif observé in vitro avec les flavones dimériques est dû à la présence d'impuretés c'est-à-dire de trois amines sympatho-mimétiques, la β Plényléthylamine, l'ortho méthoxyplényléthylamine et la Tyramine. La fraction amine isolée des fleurs d'aubépine possède en effet une forte activité inotrope positive (EC_{50} = 17mg/50 ml) alors qu'un extrait total méthanolique avait montré une action inotrope négative.

Il manque des tests par voie orale pour évaluer cet effet positif. Dans ce cas, les amines ne peuvent jouer un rôle car rapidement détruites par la monoaminooxydase.

B ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA FREQUENCE CARDIAQUE

1. Etude in vitro

Extrait	Méthode	Dose	Fréquence cardiaque
Crataegutt (61)	Coeur isolé de cobaye selon Langendorff	0,1ml en 4,5'	Augmentation de 190 à 22[illegible] battements par minute
Dimères flava-niques (53)	oreillette isolée de de lapin	40µg/ml	Pas de modification

2. Etude in vivo

a) Par voie parentérale

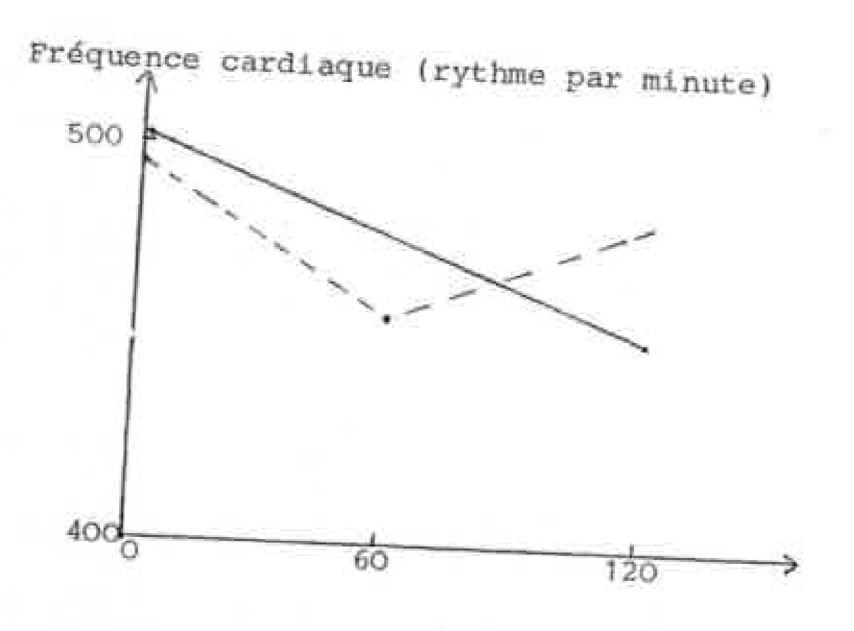
Extrait	Animal	Dose	Fréquence cardiaque
Esbericard	(19) Chien narcosé	2 ml IV 2 ml IA	Pas de modification Légère augmentation
Extrait alcoolique	(58) Cobaye anesthésié	2,15 ml/kgIV	Diminution
Extrait alcoolique	(21) Chien narcosé	0,5cm^3/kgIV	Ralentissement modéré

Interprétation des résultats (7) : Les résultats obtenus sont variables mais conduisent cependant in vivo à une diminution de la fréquence cardiaque traduisant un effet chronotrope négatif. De plus aucun essai n'est stastiquement significatif.

b- par voie orale (23)

Activité comparée de deux macérats glycéro-éthanoliques de jeunes pousses d'Aubépine sur la fréquence cardiaque chez le rat in vivo

Administration unique : 12,5 mg/kg per os exprimée en poids sec de plante.



—— Macérat glycéro-éthanolique 1982 de jeunes pousses
---- Macérat glycéro-éthanolique 1981 de jeunes pousses

Cette expérience confirme que per os on observe une légère action bradycardisante avec une diminution de la fréquence cardiaque allant de 5 à 10%.

C. ACTION DE L'AUBEPINE VIS-A-VIS DU COEUR PATHOLOGIQUE

1. Etude in vitro

a) Etude de l'action d'un extrait alcoolique d'Aubépine (61)

Matériel-Méthode : Evaluation de l'activité du Crataegutt sur le coeur isolé de cobaye selon la méthode de Langendorff quand celui-ci est altéré expérimentalement. Les résultats sont évalués à l'aide d'un stromuhr.

Résultats :

Modifications cardiaques en présence d'un excès de Potassium (0,04%) dans la solution de Tyrode.	Modifications cardiaques en présen d'un excès de K^+ (0,04%) et 0,15 m de Crataegutt en 4,5 minutes
Diminution de la force de contraction du myocarde Diminution de la fréquence cardiaque	Augmentation du débit coronaire de 39 % en 10 minutes. Rétablissement de l'amplitude de contraction du myocarde. Rétablissement de la fréquence cardiaque 265-258-278/mn.
Modifications cardiaques en présence d'un défaut de calcium (0,008%)	Modifications cardiaques en présen d'un défaut de calcium (0,008%) et 0,15 ml de Crataegutt en 4,5 minute
Baisse de contractilité du myocarde	Amélioration de la force de contraction Augmentation du débit coronaire + 63,6 % Fréquence cardiaque /mn = 203-188
Modifications cardiaques du coeur en état d'hypoxie	Modifications cardiaques du coeur en état d'hypoxie + 0,15 ml Crataegutt en 4,5'
Affaiblissement général du coeur	Augmentation de l'amplitude de contraction Amélioration du débit coronaire Fréquence cardiaque/mn = 212-240

b- Etude de l'action de dimères flavaniques (53)

Sur l'oreillette isolée de lapin, l'addition de méthanol d'éthanol ou de chloroforme provoquent une nette diminution de l'amplitude de contraction de l'oreillette.

En présence d'éthanol et de 80 µg/ml de dimères flavaniques, il y a rétablissement à la normale de l'amplitude de contraction.

Interprétation des résultats : l'Aubépine possède dans une certaine mesure une action protectrice vis à vis de certains toxiques, l'hypoxie, l'excès de potassium ou le défaut de calcium.

2. Etude in vivo (31)

But de l'étude = Rôle joué par un extrait flavonique de feuilles d'Aubépine (Crataemon) dans l'infarctus expérimental myocardique chez le rat.

Méthode : Par occlusion chirurgicale de l'artère coronaire gauche 1 mm au dessous de son embranchement avec l'aorte, on créé chez le rat un infarctus de la paroi ventriculaire gauche.

A l'autopsie, l'examen du coeur montre dans la région ischémiée des lésions de type régressif : dégénérescence et nécrose des fibres musculaires avec processus myolytique.

Au point de vue histologique : aire centrale de nécrose et fibres myocardiques lysées, entourées par du tissu conjonctif. évoluant vers la fibrose. Il est riche en collagène et fibres élastiques avec des vaisseaux sanguins se régénérant. La taille du centre de nécrose dépend de la vitesse de revascularisation, celle-ci favorisant la phagocytose du tissu nécrosé lors de l'infarctus.

Groupe contrôle = 33 rats subissant l'opération chirurgicale

Groupe expérimental = 34 rats, 2 jours avant et 10 jours après la pose de la ligature, les animaux reçoivent per os 150 mg/kg de Crataemon en solution aqueuse à 1 %.

Le 11ème jour, on tue les animaux ayant survécu à l'opération et fait un examen histologique du coeur.

Résultat :

- Mortalité (par Bronchopneumonie)

  Groupe contrôle = 6 morts/33

  Groupe expérimental = 2 morts/34

- Le volume du centre de la nécrose est inférieur chez le groupe expérimental par rapport au groupe contrôle.
- Vascularisation : Nombre de vaisseaux entre le centre de nécrose et l'épicarde.

	Capillaires	Veinules	Artériolles
Contrôle	115 ± 17	19 ± 6	12 ± 3
Expérimental	142 ± 8	28 ± 3	16 ± 3

Les différences sont statistiquement significatives.

Il n'y a pas de différence entre groupes expérimental et contrôle en ce qui concerne le nombre de veines et artères.

De même, il y a relation constante :

	Veinules/Artères	Veines/Artères
Contrôle	1,6	2,0
Expérimental	1,8	1,8

Interprétation du résultat (31) :

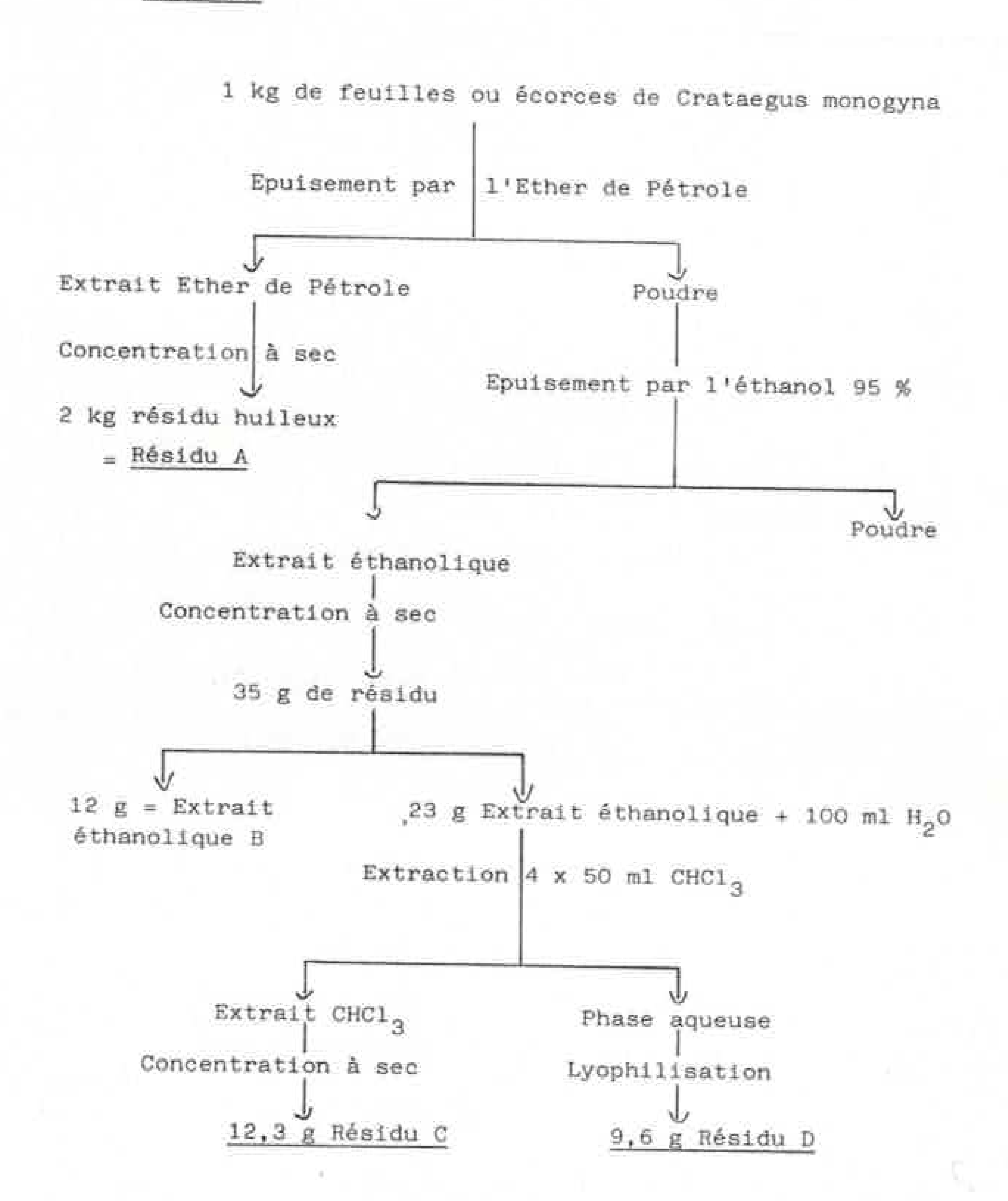
Le Crataemon amoindrit le bronchopneumonie en agissant sur la perméabilité capillaire des poumons perturbée par l'opération chirurgicale d'où une moindre mortalité dans le groupe expérimental.

D'autre part, le Crataemon stimule le processus normal de revascularisation dû à l'ischémie myocardique, en particulier la formation de capillaires car c'est un processus plus simple et plus rapide que chez les gros vaisseaux.

Une autre expérience a été menée sur des cobayes souffrant de bronchopneumonie (58) : le coeur est en bradycardie. Juste avant la mort, les cobayes reçoivent une perfusion Intra-Veineuse d'Aubépine. Après injection de 1,93 mm^3 d'extrait/g d'animal, l'électrocardiogramme est normalisé, la fréquence cardiaque rétablie.

D ACTION ANTI-ARYTHMIQUE DE L'AUBEPINE (59)

Matériel



On dissout 1 gramme de chaque extrait dans 20 ml d'un mélang eau-diméthylsulfoxide à partir duquel on fait des dilutions.

Méthode d'étude : Test de l'activité de l'aubépine contre l'arythmie induite (chez le lapin anesthésié) par l'aconitine. On enregistre l'électro-cardiogramme.

- Test d'une activité anti-arythmique curative

Après avoir determiné une arythmie chez le lapin sous narcose par injections séquentielles intra-veineuses d'aconitine, perfusion de 30 ml ou plus d'extrait brut d'aubépine par injection da la veine fémorale à la vitesse de 0,75 ml/mn. L'action curative se signale par un retour à un rythme sinusal normal.

Dose arythmogénique d'aconitine = 10 ± 2 µg/kg, entraînant une arythmie, 9 à 12 minutes après injection.

Aucun extrait d'Aubépine n'exerce dans ces conditi d'activité curative de l'arythmie.

- Test d'une activité anti-arythmique prophylactique

Groupe expérimental : Injection IV de 30 ml de fraction d'Aubépine à la vitesse de 0,75 ml/mn. Trente minutes après, injection IV de 10 µg d'aconitine toutes les 15 minutes durant 90 à 95 minutes au maximum ou jusqu'à arythmie.

Groupe contrôle : 30 ml de solvant en IV puis aconitine.

Indice de protection = Absence du développement de rythme cardiaque anormal durant l'injection d'aconitine, déterminé à partir de la quantité nécessaire d'aconitine pour faire apparaître une arythmie par rapport à la dose arythmogénique (10 µg/kg).

Extrait	Pourcentage de protection
Contrôle	0
Fraction D écorce 10 mg/ml	63
Fraction B écorce 10-20 mg/ml	67
Fraction D Feuilles 10-20 mg/ml	50
Fraction B Feuilles 10-20 mg/ml	0

Interprétation des résultats (59) : L'injection des extraits A et C entraîne la mort immédiate du lapin. La fraction D écorce à une forte activité protectrice, les fractions B d'écorce et D de feuilles une activité protectrice moyenne. De plus l'arythmie induite chez les lapins traités auparavant par l'Aubépine est douce par rapport aux contrôles.

Conclusion : L'Aubépine possède une activité anti-arythmique prophylactique vis à vis de l'aconitine.

E. INTERACTION DE L'AUBEPINE AVEC LES GLYCOSIDES CARDIOTONIQUES IN VITRO

1. Sur le coeur de l'animal à sang chaud (61)

Méthode : Etude in vitro sur le coeur isolé de cobaye selon la méthode de Langendorff de l'action de l'aubépine et de ses combinaisons avec les hétérosides cardiotoniques.

Contrôle au Stromuhr du débit coronaire et de la contraction du myocarde ainsi que de la fréquence cardiaque (effet chronotrope).

Voir tableau résumé.

Substance	Dose	Débit coronaire	Effet indiqué	Effet chronotrope
Crataegutt	0,15 ml en 4,5'	↗ 140 %	+	+
Digitoxine	3γ	↘ 5-18%	+	-
Digoxine	15γ	↘ 5-14%	+	-
g Strophanthine	5,5 - 8 γ	Pas de changement	+	+
Digitoxine + Crataegutt	3 γ + 0,15 ml	↗ 76,9 %	potentialisation(+)	antagonisme
Digoxine + Crataegutt	15 γ + 0,15 ml	↗ 55,5 %	potentialisation(+)	antagonisme
g Strophanthine + Crataegutt	8,5γ + 0,15 ml	↗ 31,4 %	potentialisation (+)	
Digoxine	45 γ (Dose toxique)	↗ 35,7%	-	202-272-203/mn
Digoxine+Crataegutt	45 γ + 0,45 ml	↗ 126,6%	Rétablissement de l'amplitude	202-222/mn

Interprétation du résultat (61) : Pour l'auteur, les combinaisons Aubépine-Hétérosides cardiotoniques sont favorables par potentialisation de l'effet coronarodilatateur et de l'effet inotrope positif. De plus l'Aubépine diminuerait la toxicité des hétérosides cardiotoniques.

2. Sur le coeur de l'animal à sang froid (8)

a- Coeur isolé de Grenouille (8)

Extrait	Concentration	Amplitude de contraction du coeur
Extrait alcoolique	$0,15 \times 10^{-3}$ g/l	Augmentation de 11%
Strophanthine	$0,2 \times 10^{-5}$ g/l 7×10^{-6} g/l	Sans changement Sans changement

Extrait	Dose	Amplitude de contraction du coeur
Digitoxine	$0,1x10^{-5}$ g/l	Sans changement
	$7x10^{-6}$ g/l	Sans changement
Convallatoxine	$0,04x10^{-5}$ g/l	sans changement
	$7x10^{-6}$ g/l	Augmentation 15%
Aubépine + Strophanthine	$0,15x10^{-3}$ g/l + $0,2x10^{-5}$ g/l	Augmentation 25%
Aubépine + Digitoxine	$0,15x10^{-3}$ g/l + $0,1x10^{-5}$ g/l	Augmentation 25%
Aubépine + Convallatoxine	$0,15x10^{-3}$ g/l + $7x10^{-6}$ g/l	Augmentation 25%

b- Coeur épuisé isolé de Grenouille (8)

Substance	Dose	Amplitude de contraction du coeur	
			+ $0,510^{-3}$ g/l Aubépine
Extrait alcoolique d'Aubépine	$0,5x10^{-3}$ g/l	Augmentation 75%	
Strophanthine	$0,2x10^{-5}$ g/l	Sans changement	Renforcement
	$7x10^{-6}$ g/l	↗16-30%	
Digitoxine	$0,1x10^{-5}$ g/l	Sans changement	Non renforcé
	$7x10^{-6}$ g/l	↗ 16-30%	Non renforcé
Convallatoxine	$0,04x10^{-5}$ g/l	Sans changement	
	$7x10^{-6}$ g/l	↗ 16-30%	Renforcement

Il y a donc bien potentialisation des effets entre glycosides cardiotoniques et aubépine.

IV ACTION DE L'AUBEPINE SUR LES METABOLISMES

A ACTION DE L'AUBEPINE SUR LE METABOLISME RESPIRATOIRE (33)

Chez des chiens narcosés non soumis à une respiration artificielle, on enregistre le volume respiratoire et les échanges gazeux (absorption d'oxygène, rejet de gaz carbonique) avec l'appareil de Reinschen.

On ne constate aucune modification du volume respiratoire par minute ni variation appréciable de la consommation d'oxygène ou de la production de CO_2 après injection intra-veineuse de 2 cm3 d'Esbericard.

B ACTION DE L'AUBEPINE SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE (8)

Après injection I.V. de 10 mg/kg d'oligomères procyanidine de faible degré de polymérisation, il y a chez le rat après 1 heure, baisse significative du taux de cholestérol et de triglycérides sériques. Chez le lapin, de tels effets n'ont toutefois pas été observés.

L'administration I.V. 2 fois par semaine de 1,5 ml de Crataegutt empêche chez la poule recevant du cholestérol, des modifications artériosclérotiques de l'aorte et l'accumulation de cholestérol dans le foie. Le résultat est significatif par rapport à un groupe recevant une alimentation normale et un autre groupe recevant du cholestérol.

Des résultats identiques sont obtenus avec Crataegutt pentagyne administré par voie orale à des lapins soumis à un régime athérogène.

Conclusion (8) : l'Aubépine possède aussi par voie orale, une action protectrice contre l'hypercholestérolémie alimentaire en expérience animale, facteur de risque pour une sclérose coronaire.

V ACTIVITE DE L'AUBEPINE SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

A ACTIVITE D'UN EXTRAIT TOTAL D'AUBEPINE ET DE CERTAINES DE SES FRACTIONS (12) (13)

Rappel : un extrait hydroalcoolique sec (alcool à 60°) de rameaux fleuris d'Aubépine est épuisé successivement par :

- Le Méthanol : donnant un extrait MeOH (rendement 60 %) contenant des flavonoïdes dont l'Hyperoside, la Vitexine et la Vitexine rhamnoside, les acides caféique et chlorogénique, des traces de composés polyphénoliques de poids moléculaire 600 à 1200, de la choline.

- L'eau : donnant un extrait H2O (rendement 35 %) contenant des composés polyphénoliques condensés de poids moléculaire 1500 à 3000.
- Le résidu insoluble dans l'eau se dissout dans l'eau additionnée de soude pH = 8 : extrait H2O - alcaline (rendement 5 %) contenant des tanins de poids moléculaire 3000 et 1,55 g % d'azote.

Les extraits sont administrés à l'animal à des doses proportionnelles à leur rendement à l'extraction.

Le but des tests est de confirmer ou d'infirmer la réputation de plante sédative de l'Aubépine : rechercher les extraits actifs sur le S.N.C. à l'aide de tests simples :

1) La variation de la température corporelle : l'hypothermie est un signe caractéristique de l'action des neuroleptiques.

2) La durée de la narcose barbiturique qui est allongée par tous les dépresseurs du S.N.C.

3) L'étude du comportement des souris dans certaines conditions.

1- Action de l'Aubépine sur la température corporelle (12) (13)

a- Par voie parentérale

Méthode : la température rectale des souris est mesurée toutes les 30 minutes. La substance étudiée est injectée en intra-péritonéale après la mesure de la température au temps t = 0.

Les lots témoins ne montrant pas de variation significative de la température après injection d'une solution de NaCl 9 ‰ , on compare la température de chaque animal à celle mesurée au temps t = 0 ; la différence entre les 2 valeurs est appréciée à l'aide du test t de comparaison d'échantillons appariés.

Résultat :

Substance injectée	Nombre d'animaux	t = 0 (minutes)	30'	60'	90'	120'
NaCl 9 ‰ 10mg/kg	5	36,58 ± 0,52	36,96 ± 0,39	36,88 ± 0,26	36,74 ± 0,36	36,92 ± 0,31
Extrait total 100mg/kg	3	36,43 ± 0,06	35,07 ± 0,55*	34,73 ± 0,81*	36,40 ± 0,62	36,90 ± 0,69
Extrait MeOH 55mg/kg	5	36,56 ± 0,30	36,38 ± 0,72	36,88 ± 0,44	36,60 ± 0,43	36,80 ± 0,20
Extrait H2O 40mg/kg	5	36,90 ± 0,19	35,42 ± 0,65 **	35,04 ± 1,85 **	36,25 ± 0,80	36,40 ± 0,71
Extrait H2O alcaline 5mg/kg	3	36,50 ± 0,60	34,97 ± 0,21*	33,77 ± 0,15 **	35,87 ± 0,31	36,37 ± 0,21

* $p < 0{,}05$ ** $p < 0{,}02$ *** $p < 0{,}01$.

Interprétation du résultat (13)

L'extrait total, les extraits H20 et H20 alcaline possèdent une activité hypothermisante, le maximum étant atteint 60 minutes après injection avec diminution parallèle de l'activité spontanée de l'animal. L'extrait MeOH est inactif.

On ne peut encore distinguer une action directe sur le centre de la thermorégulation d'une intervention au niveau des effecteurs périphériques.

b- Par voie orale (13)

Extrait	Nombre d'animaux	Dose	t = 0	30'	60'	90'	120'
Extrait H20 alcaline	8	100mg/kg	36,13 ± 0,34	35,28 ± 0,18	35,70 ± 0,29	35,92 ± 0,23	35,72 ± 0,15

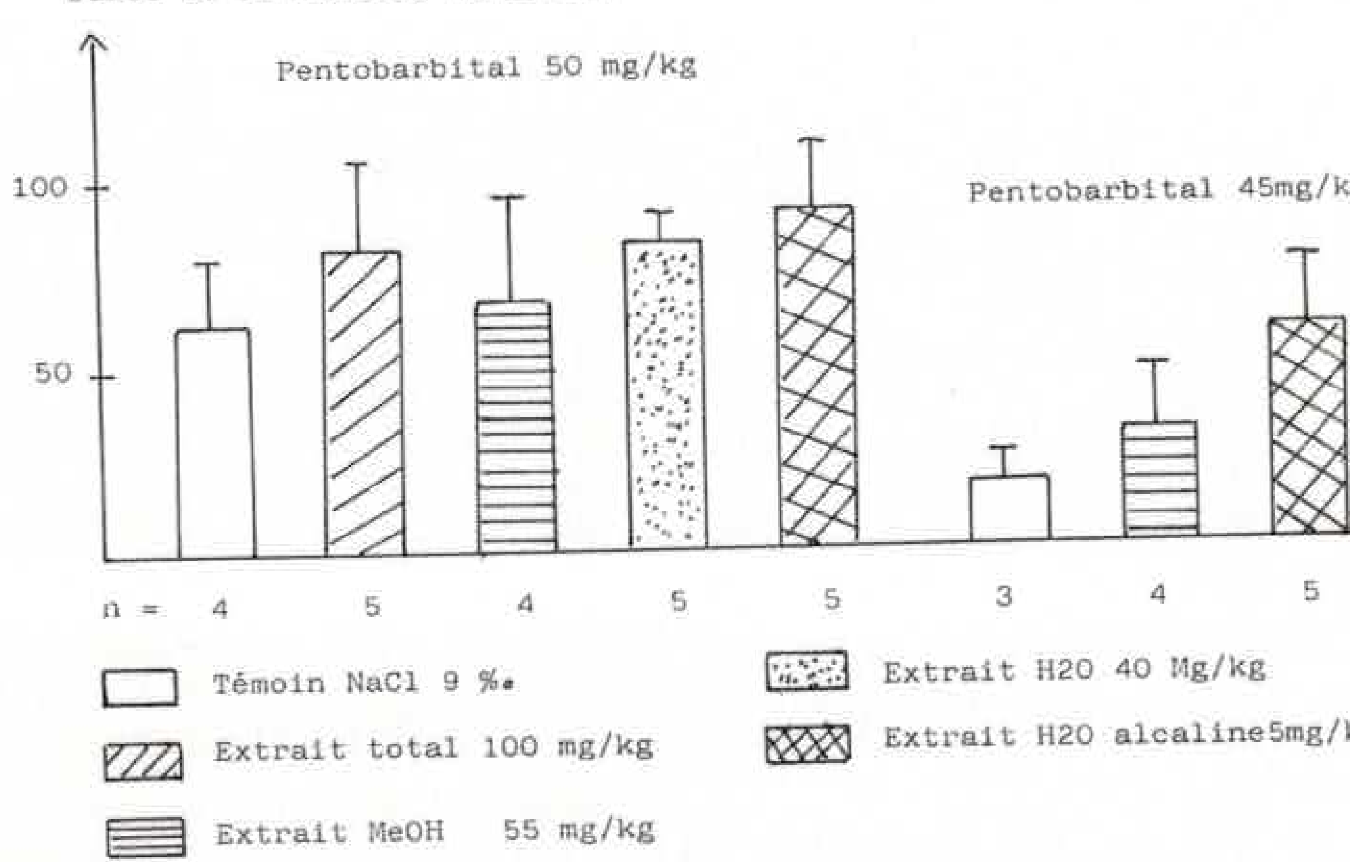
L'administration de l'extrait H20 - alcaline par voie orale n'a pas d'influence sur la température des souris.

2- Potentialisation de la narcose barbiturique (12) (13)

Méthode : des souris reçoivent par voie intra-péritonéale, 30 minutes avant injection I.P. de pentobarbital 50 mg/kg, l'extrait essayé. La narcose est caractérisée par la disparition du réflexe de retournement : l'animal accepte d'être allongé sur le dos ; la durée de la narcose est définie comme le temps séparant l'abolition de ce réflexe et sa réapparition chez un même animal.

Résultat :





Interprétation du résultat (13) :

Après administration intra-péritonéale de l'extrait total d'Aubépine, des extraits H20 et H20 alcaline, il y a allongement significatif de la narcose barbiturique durant 60 minutes.

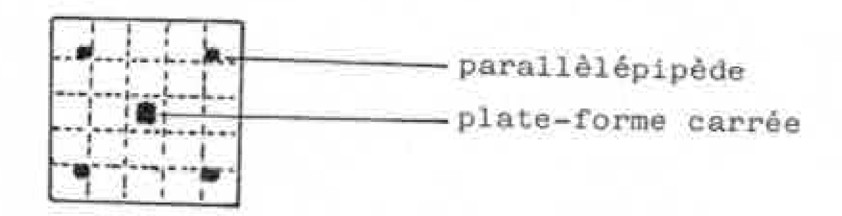
Ces extraits ont donc une activité de type neuro-dépresseur qui demande à être approfondie.

L'extrait MeOH est inactif.

3- Test de l'open-field (13) :

a- Essai par voie intra-péritonéale :

But de l'essai : objectiver une action centrale de l'Aubépine en relevant plusieurs paramètres sur le comportement des souris isolées dans une cage de Hinschberger en plastique, à l'abri de bruits soudains, courants d'air, variations de température et éclairée par en-dessus.

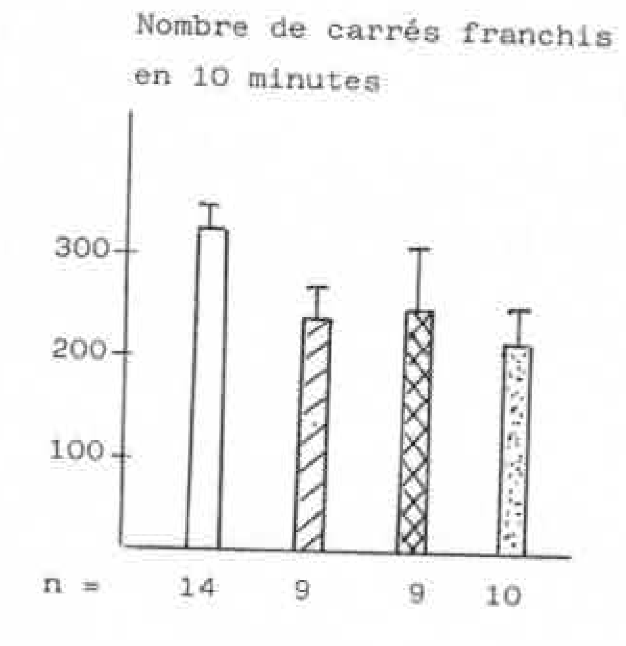


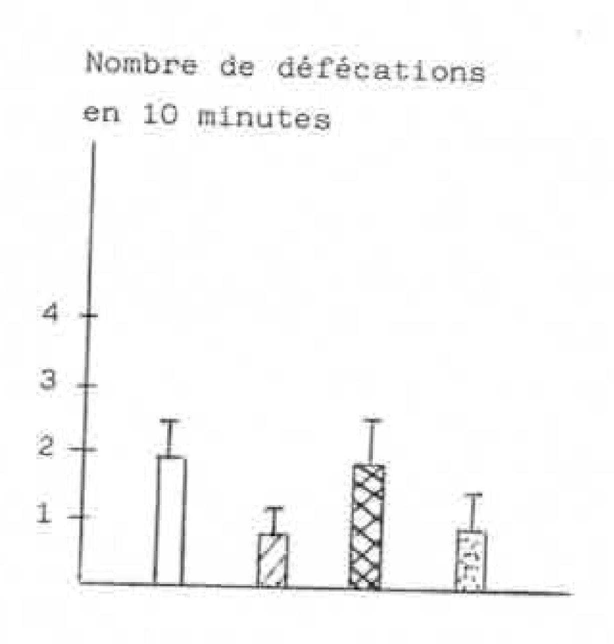
Méthode : des souris de 8 semaines sont isolées dans une cage une semaine avant le test. On injecte la substance essayée (ici l'extrait H2O alcaline qui s'est montré le plus efficace lors des deux tests précédents) 30 minutes avant le début de l'expérience, période pendant laquelle la souris est replacée dans sa cage d'isolement. Au début du test, les animaux sont placés dans un coin de l'appareil. On note chaque minute :

- Nombre de carrés traversés : déplacement,
- Nombre de défécations : indice du niveau de réactivité émotionnelle.

Chaque essai dure dix minutes.

Résultat :





OPEN-FIELD : essai de l'extrait H2O - alcaline, voie I.P.

NaCl 9 ‰ — Extrait H2O alcaline 1 mg/k

Extrait H2O alcaline 5 mg/kg — Extrait H2O alcaline 10mg/k

Interprétation du résultat (13) :

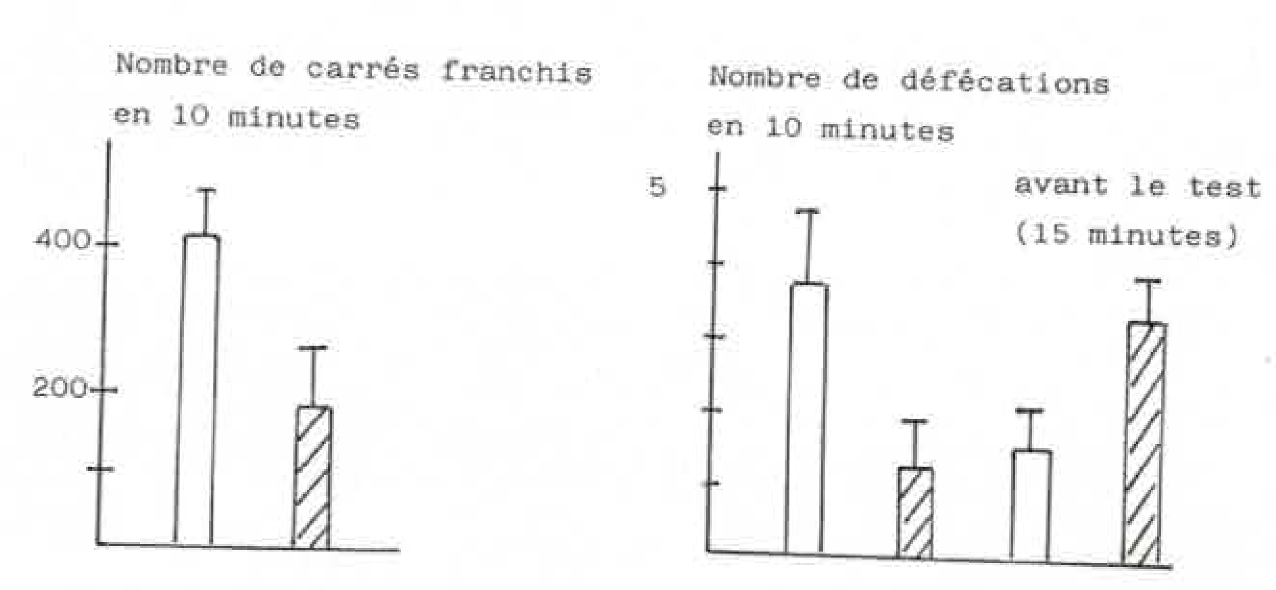
L'absence de stricte relation dose/effet et l'observation chez certaines souris d'un comportement typique de la douleur suggèrent que les modifications observées sont en partie le reflet d'un effet algogène ou toxique des extraits étudiés. Les tanins peuvent en effet provoquer une nécrose localisée lors de l'injection intra-péritonéale, susceptible de provoquer une réaction douloureuse à l'origine d'inhibitions : diminution des déplacements et diminution des défécations observées avec l'extrait H2O - alcaline.

On vérifie cette observation par :

- <u>Le test de l'open-field sous action d'une injection d'algogène</u> :

  quinze minutes avant le début de test, l'animal reçoit 10 mg/kg d'une solution d'acide acétique à 0,6 % par voie I.P.

<u>Résultat</u> :



OPEN-FIELD : effet d'une injection algogène.

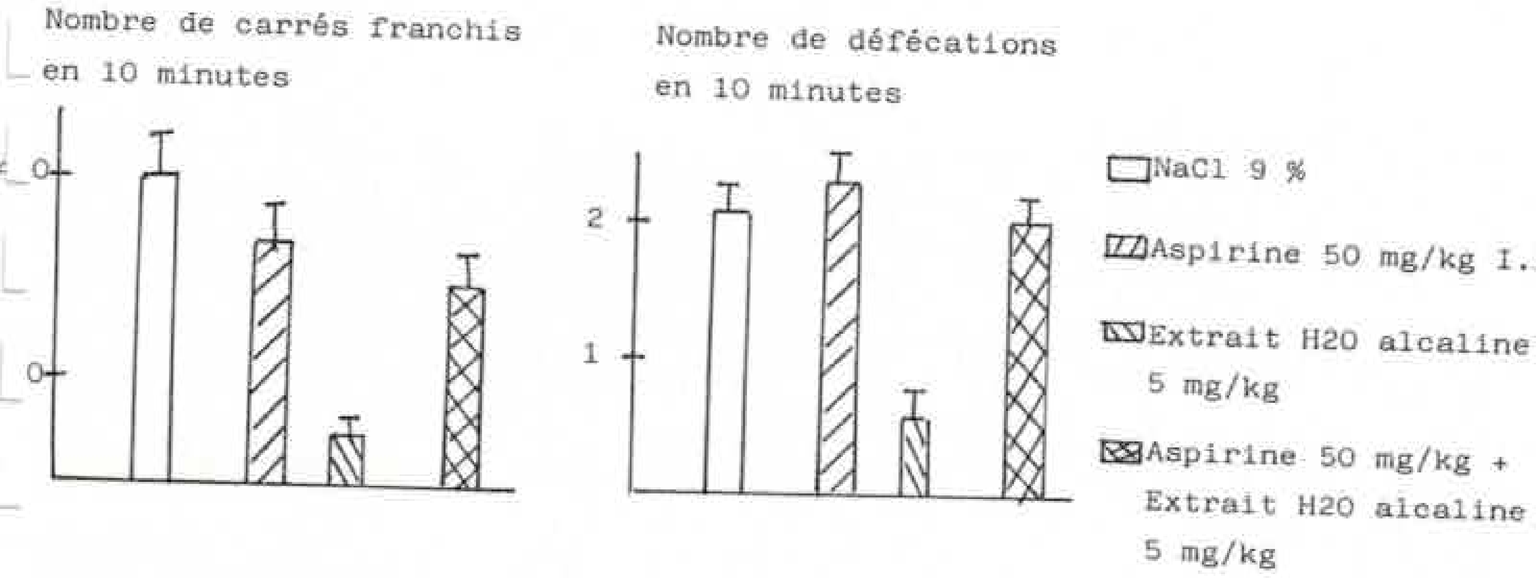
NaCl 9 ‰

CH3 CooH 0,6 %

<u>Interprétation du résultat</u> :

<u>Diminution significative des déplacements</u>. La diminution du nombre de défécations peut être dûe au fait que les souris défèquent d'avantage entre le moment de l'injection et le test.

- Le test de l'open-field sous action d'un analgésique :

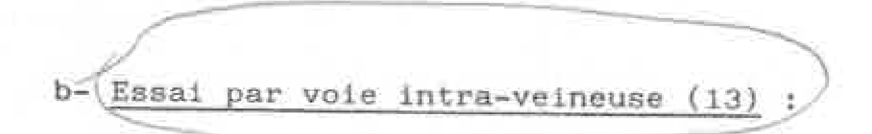


OPEN-FIELD : effet de l'aspirine I.P. sur l'action de l'extrait H20 alcaline I.P.

Interprétation du résultat (13) :

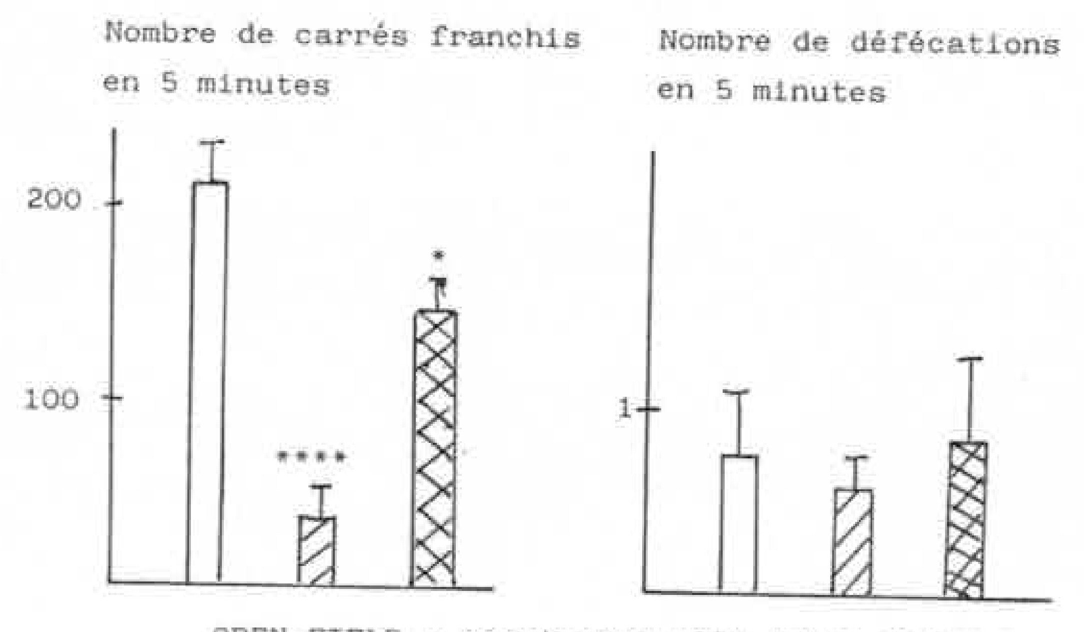
Le prétraitement à l'aspirine modifie totalement le comportement des animaux recevant l'extrait, puisqu'il ne diffère plus alors significativement de celui des animaux témoins.
L'aspirine antagonise donc les effets neuro-dépresseurs de l'extrait H20 - alcaline de l'Aubépine, les inhibitions de comportement étant alors dûes à l'injection douloureuse de cet extrait.

Il convient de tester une voie non douloureuse : la voie orale nécessite de trop grandes quantités d'extrait et l'extrait H20 - alcaline s'est montré inactif sur l'abaissement de la température corporelle par cette voie.



b- Essai par voie intra-veineuse (13) :

Comparaison des résultats obtenus par injection dans une veine de la queue, 15 minutes avant l'expérience, d'extraits à tester.
Durée de l'expérience : 5 minutes.



OPEN-FIELD : essais par voie intra-veineuse

NaCl 9 ‰ — Extrait H2O alcaline 5 mg/kg — Tanins de Ratanhia 5 mg/kg

Interprétation du résultat (13) :

- L'extrait H2O - alcaline d'Aubépine, constitué de tanins diminue le nombre de déplacements dans l'open-field.

- Les tanins catéchiques de Ratanhia présentent une activité du même type. Or, cette plante n'a jamais été décrite comme possédant la moindre activité sur le système nerveux central.

La voie intra-veineuse montre que l'action sur les déplacements et défécations existe en évitant le phénomène douleur pour l'extrait de tanins d'Aubépine et les tanins catéchiques de Ratanhia.

Pour expliquer une action des procyanidines et tanins sur le système nerveux central, dont on sait qu'ils ne passent pas les membranes et tissus nerveux, deux phénomènes sont possibles :

Soit, les tanins sont combinés de façon réversible aux une substance active (alcaloïde, peptide). Cette substance est libérée dans l'organisme et c'est elle qui agit.

Soit, les tanins n'agissent qu'indirectement en provoquant par une intéraction avec un système biologique, la libération de molécules endogènes possédant une action contrôle. Sans pour cela exclure une action "faussement positive", par exemple, libération d'histamine modifiant le comportement.

4- Conclusion des tests de Beretz (13) :

L'extrait total d'Aubépine injecté par voie intra-péritonéale provoque chez la souris un abaissement de la température corporelle et un allongement de la narcose barbiturique, ainsi qu'une diminution du comportement dans un open-field.

C'est la fraction hydrosoluble (extraits H20 et H20 alcaline) de l'extrait d'Aubépine qui possède seule cette activité alors que la fraction MeOH est inactive.

Toutefois, la spécificité de cette action est remise en cause parce que la douleur dûe à l'injection pourrait jouer un rôle dans les modifications du comportement observées et par le fait qu'un extrait de Ratanhia préparé dans les mêmes conditions que l'extrait H20 - alcaline présente le même type d'activité.

D'autres observations parlent cependant en faveur d'une action centrale de l'Aubépine :

- L'injection d'extrait de Crataegus entraîne une modification de la forme des ondes cérébrales (30).

- Lors d'expériences de circulation sanguine croisée et séparation du courant sanguin de la tête de celui du tronc chez 7 paires de chiens chloralosés, l'injection de 10 ml d'extrait d'Aubépine aqueux par voie intra-veineuse dans le torrent circulatoire de la tête du chien accepteur provoque des modifications de l'électro-cardiogramme chez les deux chiens. Il y a donc intervention de l'Aubépine au niveau du système nerveux central (28).

B ACTIVITE DES PROCYANIDINES OLIGOMERES D'AUBEPINE DE FAIBLE DEGRE DE POLYMERISATION OU OL 1 (54)

Les OL -1 sont des dérivés éthérés de 3', 4', 5, 7 tetrahydroxyflavandiol 3, 4.

1- Influence des OL 1 sur la température corporelle

Après mesure de la température rectale de base des souris reçoivent soit :

- 5 mg/kg d'OL-1 I.P.
- 0,2 ml NaCl 9 ‰ I.P.

On prend la température rectale 30, 60, 90 et 120 minutes après administration.

Résultat

Substance	Dose	Nombre d'animaux	Variation de température 30'	60'	90'
NaCl 9 ‰	0,2 ml	10		+ 0,3 ± 0,1	+ 0,1 ± 0,1
OL-1	5mg/kg	10	- 2,3 ± 0,4	- 1,3 ± 0,3	+ 0,7 ± 0,2

Interprétation du résultat (54) :

La différence entre animaux de contrôle et animaux traités est significative.

Les OL -1 d'Aubépine possèdent une activité hypothermisante par intervention sur l'hypothalamus.

2- Potentialisation de la narcose barbiturique par les OL 1 :

Méthode : 80 minutes avant injection de 80 mg/kg d'Hexobarbital en I.V., administration intra-péritonéale à la souris de 2 ou 5 mg/kg d'OL-1 pour le groupe expérimental et 0,2 ml de NaCl 9 % pour le groupe contrôle. On évalue la durée de la narcose pour chaque groupe.

Résultat :

Substance	Dose	Durée de la narcose
NaCl 9 %0	0,2 ml	16' 24 sec ± 2' 12 sec
OL-1	2 mg/kg	28' 28 sec ± 5' 45 sec
OL-1	5 mg/kg	28' 27 sec ± 7' 23 sec

Interprétation du résultat (54) :

La différence entre groupe traité et groupe contrôle est significative ($p < 0,01$).

Les OL-1 possèdent un effet sédatif net.

3- Influence des OL 1 sur le comportement agressif :

Méthode : création d'une agressivité chez l'animal par isolement à long terme.

On mesure le temps de latence s'écoulant entre l'introduction de la souris dans la cage et le premier signe d'agressivité : le degré d'agressivité est alors évalué par les rapport de Valzelli.

Les OL_1 sont injectées par voie intra-péritonéale 45 minutes avant le début de l'expérience, les animaux de contrôle recevant du NaCl 9 ‰.

Substance	Dose	Degré d'agressivité	
		14ème jour	28ème jour
NaCl		49,1 ± 4,9	62,5 ± 3,1
OL 1	2 mg/kg	39,6 ± 4,1	16,7 ± 6,2*
OL 1	5 mg/kg	18,8 ± 8,3*	16,7 ± 4,1*

* $p < 0{,}01$ - Après 180 minutes, l'inhibition d'agressivité est totale.

Interprétation du résultat (54) :

L'influence des OL 1 sur le système nerveux central est lente mais persistante. Les OL 1 ont un effet sédatif.

Conclusion (54) :

Les oligomères procyanidines de faible degré de polymérisation ont un effet hypothermisant et sédatif d'origine centrale, le point d'impact étant le système limbique et l'hypothalamus.

VI ACTIVITE DE L'AUBEPINE SUR L'HYDROLYSE DE L'A.M.P. CYCLIQUE (13)

Une hypothèse du mécanisme d'action de l'Aubépine pourrait être un rôle dans la régulation du taux de nucléotides cycliques en inhibant la phosphodiestérase ou PDE. En effet, on constate une augmentation du taux des nucléotides cycliques pour des flavonoïdes dont les propriétés pharmacologiques sont liées à une action : sédative, inotrope, positive, spasmolytique, diurétique, anti-inflammatoire, diminution de la perméabilité capillaire, radio-protection.

Principe du dosage de l'activité phosphodiestérasique par séparation des produits du substrat à l'aide d'une résine échangeuse d'anions :

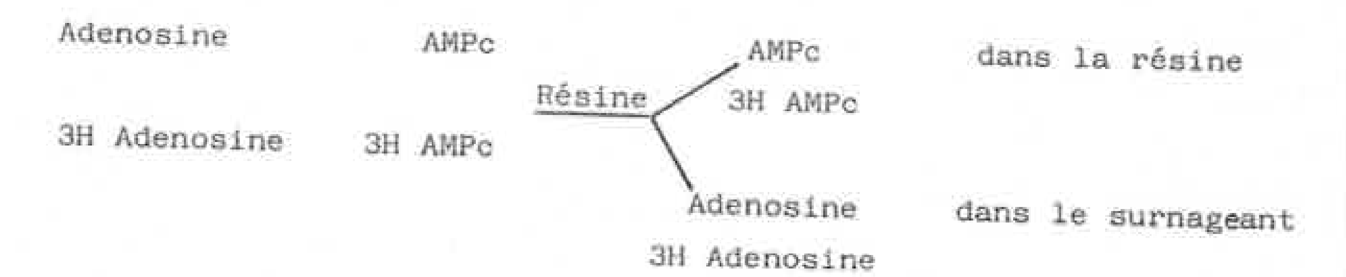
1ère incubation :

AMPc / 3H AMPc —PDE→ 5' AMP / 3H 5' AMP + AMPc / 3H AMPc

2ème incubation :

5' AMP / 3H 5' AMP + AMPc / 3H AMPc —5' nucléotidase en excès→ Adénosine / 3H adénosine + AMPc / 3H AMPc

Addition de résine échangeuse d'anions :



On procède ensuite au comptage dans le surnageant.

Les inhibiteurs sont comparés à l'aide de leur dose inhibitrice 50 % I50, c'est-à-dire la dose qui diminue de moitié l'activité de l'Enzyme.

Enzyme : phosphotiestérase soluble de coeur de boeuf.

Pour un extrait hydroalcoolique de rameaux fleuris d'Aubépine : I D50 = 50 µg/ml.

RESUME : ACTION DE L'AUBEPINE ET DE SES CONSTITUANTS EN EXPERIMENTATION ANIMALE (5) (7) (8)

Substance	Action sur le coeur			Vaisseaux	Pression artérielle	Activité sédative	Lutte contre hypercholestérolémie	Mode d'action
	Inotrope	Chronotrope	Antiarythmique					
Aubépine (extrait aqueux ou alcoolique)	+	+ in vitro - in vivo	oui	Coronaro-dilatation Spasmolytique	↘ (Extraits alcooliques)	oui	oui	
Flavonoïdes	+	Sans changement	oui	Coronaro-dilatation Spasmolytique		non		Inhibition de PDE
Oligomères procyanidines faible degré de polymérisation	+			Coronaro-dilatation	↘	oui	oui	β 1 stimulant léger
Procyanidines (Polymères flavaniques)	+			Coronaro-dilatation	↘			Inhibition de PDE Action stabilisatrice de membrane
Heptahydroxy flavan triside	+			Coronaro-dilatation				
Tanins	+			Coronaro-dilatation	↗	oui		
Amines volatiles	+							
Acides triterpéniques			oui	Controversé	↘	non	oui	

CHAPITRE IV

ETUDE CLINIQUE

ETUDE CLINIQUE DE L'AUBEPINE

Extrait alcoolique de feuille et fleur

A) ACTION DE L'AUBEPINE DANS LES MALADIES CARDIAQUES

I Etude clinique d'un extrait d'Aubépine (Crataegutt) dans les maladies cardiaques d'origine ischémique, ou liées à une hypertension artérielle : étude multicentrique en double aveugle versus placebo, réalisée au Japon en 1981. Departement de cardiologie de l'hôpital de Tonar, sous la direction de Mitsuaki Iwamoto (Planta Medica journal of medicinal plant research - 35 -).

Méthode d'étude :

Observation en double aveugle en milieu hospitalier de l'effet d'un traitement en ambulatoire au Crataegus comparé à un placebo sur les troubles de l'insuffisance cardiaque avec analyse statistique des résultats.

Les médecins sélectionnent 102 patients souffrant d'insuffisance cardiaque d'origine ischémique ou hypertensive aux stades II et III (classification de la New York Heart Association) après que tout signe d'angine de poitrine ait été écarté.

Les symptômes retenus sont :
Nycturie- Dyspnée d'effort - Palpitations - Sensations douloureuses dans la poitrine - Oedèmes de stase.

La pression diastolique pour tous les malades est inférieur à 114 mm Hg, la pression systolique n'étant pas limitée.

Autant que possible, toute médication associée est évitée sauf si les patients sont déjà traités depuis plus d'un mois avec un médicament et que leur insuffisance cardiaque est toujours aux stades II et III.

Mode d'emploi et posologie :

Dragées de Crataegus à 30 mg d'extrait d'Aubépine et dragées de Placebo identiques.

6 dragées par jour en 3 prises après les repas durant six semaines avec possibilité de 6 à 9 dragées par jour, selon avis du médecin traitant, à partir de la troisième semaine.

Paramètres de l'essai :

Six paramètres sont évalués toutes les deux semaines :

- Symptômes subjectifs : Dyspnées - Palpitations - Sensation douloureuses dans la poitrine
- Symptômes objectifs : Oedèmes de stase - Nycturie - Oligurie.

Les autres paramètres étudiés sont :

- Electrocardiogramme avec prise en compte de 4 critères :
  - . Modifications ischémiques de ST et T
  - . Extrasystoles
  - . Hypertrophie ventriculaire gauche
  - . Fréquence des battements cardiaques
- Electrocardiogramme après effort
- Pression artérielle
- Pouls
- Radiographie thoracique
- Protéinurie
- Transaminases hépatiques et cardiaques.

Cotation

L'amélioration de l'état général, l'amélioration de chacuns des symptômes subjectifs et objectifs, l'analyse générale du résultat des tests de la fonction cardiaque sont définis en "degrés" par rapport à l'état de santé de départ :

- Amélioration de 3 à 4 degrés : amélioration nette		
- Amélioration de 2 degrés : amélioration modérée		"Amélioration"
- Amélioration de 1 degré : amélioration légère		
- Si l'état reste identique : sans changement		"Pas d'amélioration"
- Agravation de 1 degré ou plus: agravation		

Pour l'E.C.G. : Amélioration - Sans changement - Agravation - Analyse impossible

Résultats

Sur 102 patients traités, 14 n'ont pas suivi le protocole et 8 autres ne sont pas revenus aux visites.
L'analyse porte donc sur 80 patients. L'ouverture des scellés de codage montre que 35 patients étaient traités par le Crataegus,

45 patients étaient traités par le Placebo.

L'analyse statistique met en évidence qu'au départ les deux groupes de malades ne diffèrent pas et sont comparables

EFFICACITE DU TRAITEMENT

Tableau récapitulatif

Critères	Pourcentage d'amelioration		Différence significative entre les deux groupes
	Crataegus	Placebo	
Etat général	77,1 %	48,9 %	$p < 0,01$
Symptômes subjectifs	80 %	55,6 %	$p < 0,001$
Fonction cardiaque en général	74,3 %	46,7 %	$p < 0,01$
Dyspnées	76,5 %	43,9 %	$p < 0,01$
Palpitations	75,9 %	41,2 %	$p < 0,01$
Sensations de malaise dans la poitrine	71 %	58,5 %	N.S.
Oedèmes de stase circulatoires	83,3 %	45,5 %	$p < 0,05$
Nycturie	59,1 %	39,8 %	N.S.
Oligurie	71,4 %	50,0 %	N.S.
Radio thoracique (stase pulmonaire)	81,8 %	45 %	$p < 0,05$
Protéinurie	40,0 %	60,0 %	N.S.

Les résultats de l'E.C.G. ne montrent pas de changement pour les deux groupes.

Chez le groupe Placebo, il y a après traitement tendance à l'augmentation des pressions diastoliques et systoliques ainsi que de la fréquence cardiaque.

Chez le groupe Crataegus, il y a tendance à la baisse ou baisse non significative de ces deux valeurs. Le paramètre "Pression artérielle moyenne x Fréquence cardiaque" chute de façon significative ($p < 0,05$) dans ce groupe.

Pour les autres critères étudiés, aucune différence notable n'a été enregistrée.

Effets secondaires

Dans le groupe Crataegus, un cas a été relevé : nausées, malaises disparaissant spontanément et ne nécessitant pas l'arrêt du traitement.

Conclusion

Le crataegus s'est montré supérieur au Placebo, tant sur les symptômes objectifs que subjectifs. L'Aubépine améliore le métabolisme du myocarde dans les maladies cardiaques.

II Essai clinique d'une preparation de crataegus pentaerythrityltetranitrate chez des malades du grand âge atteints de sclérose des coronaires (A. Beier, RP Königstein et V Samec). En association à des digitaliques et à des dérivés nitres (Wiener Medizinische wochenschrift 1974 - 10).

Méthode d'étude :

Dans un hôpital sont sélectionnées 63 personnes de 70 à 90 ans atteintes de sclérose coronaire sévère à l'origine de décompensation cardiaque chronique, accompagnée de stenose cardiaque douloureuse et troubles du rythme. Leur etat nécessite un traitement par digitaliques et derivés nitrés, la plupart du temps.

Chez ces personnes équilibrées au mieux avec des digitaliques si nécessaire, est mené un essai en double aveugle.

Traitement :

Les patients sont séparés en deux groupes recevant :

- La préparation n° 1 (Nitro - Crataegus)
  - Pentaérythrityltétranitrate (PETN) 30 mg
  - Extrait de feuilles de Crataegus 10 mg
  - Extrait de fruits de Crataegus 40 mg
- La préparation n° 2
  - Pentaérythrityltétranitrate (PETN) 30 mg

selon le schéma suivant :

Périodes	Groupe I	Groupe II
Prépériode : 2 semaines	Digitaliques si nécessaire plus dérivé nitré retard	
Période test n° I 5 semaines	Digitaliques si néces--saire + 2 x 1 dragée de préparation n° 1	Digitaliques si néces-saire + 2 x 1 dragée de préparation n° 2
Période contrôle : 2 semaines	Digitaliques si nécessaires plus dérivé nitré retard	
Période test n° II : 5 semaines	Digitaliques si néces--saire + 2 x 1 dragée de préparation n° 2	Digitaliques si neces--saire + 2 x 1 dragée de préparation n° 1

Les deux préparations sont d'apparence identique.

Paramètres d'objectivation de l'essai

5 electrocardiogrammes au repos et après l'effort
Pression artérielle
Pouls
Symptômes associés à l'état.

Résultat

* Parmi les 63 patients traités, deux sont morts de décompensation cardiaque. Il reste donc 61 patients, 6 hommes et 55 femmes comparables au départ du point de vue statistique

* Pour les 7 patients ne nécessitant pas de traitement digitalique associé, on constate :

  - Pas de différence entre les résultats du traitement par PETN seul et Nitro-Crataegus : 3 cas

  - Patiente atteinte de stase pulmonaire fréquente montrant un pouls plus rythmé avec le Nitro-Crataegus qu'avec le PETN seul : 1 cas

  - Nitro-Crataegus mieux supporté sur le plan gastrique que le PETN seul qui entraîne une forte diurèse : 1 cas

  - Pouls plus rythmé sous Nitro-Crataegus que sous PETN seul : 1 cas

  - Pression artérielle plus stable sous Nitro-Crataegus que sous PETN seul : 1 cas

Sur 7 cas, il y a donc 4 améliorations : l'échantillonnage est cependant trop faible pour se livrer à une analyse statistique.

* Pour les 54 patients traités par digitalique, on constate :

  . Pas de différence entre les résultats du traitement par PETN seul et Nitro-Crataegus : 38 cas

  . Récidive d'infarctus du myocarde sous PETN : 1 cas

  . Récidive d'infarctus du myocarde sous Nitro-Crataegus : 1 cas

  . Pression artérielle plus stable sous Nitro-Crataegus que sous PETN seul : 6 cas

  . Fonction cardiaque plus rythmée sous Nitro-Crataegus que sous PETN : 3 cas

  . Sous Nitro-Crataegus, pas d'attaque, sous PETN seul, cas rares mais enregistrables d'angine de poitrine : 4 cas

  . Sous PETN seul grande fatigabilité, non observée avec le Nitro-Crataegus : 1 cas

L'analyse statistique par le test de Wilcoxon montre une amélioration dans 25 % des cas ($p > 0,001$) sous thérapie avec le Nitro-Crataegus.

Sans digitaliques, les résultats auraient sans doute été meilleurs.

<u>Conclusion</u> : l'association digitaliques - Nitro-Crataegus est bénéfique et préférable à la combinaison digitalique dérivé nitré retard.
L'effet de l'Aubépine se manifeste ici par une rythmisation du fonctionnement cardiaque, stabilisation de la Pression sanguine, diminution du nombre des attaques sténo-cardiaques.

B ACTION DE L'AUBEPINE SUR LA PRESSION ARTERIELLE

1 Traitement de l'hypertension arterielle par la teinture de Crataegus à haute dose.

Combemale, Legrand et coll. Paris medical - Décembre 1944 - (21).

Une étude a été menée sur des malades hypertendus externes et hospitalisés, le but étant de traiter cette hypertension artérielle avec une teinture alcoolique (60°) de Crataegus à haute dose.

Traitement

- Malades externes (11) : 3 à 6 grammes de teinture alcoolique en 3 prises durant 15 jours à plusieurs semaines pour certains
- Malades hospitalisés (12) : 3 grammes de teinture alcoolique de Crataegus pendant 8 jours

Analyse des résultats

- Pour les malades externes, on compare la tension initiale à la tension en fin de traitement
- Pour les malades hospitalisés, on compare la tension initiale, la tension en cours de traitement puis 12 et 20 jours après arrêt de ce traitement.

Résultats

Les résultats obtenus sont considérés comme bons : dans la plupart des cas la tension est abaissée de façon notable: 2 à 7 mm de Hg. La chute de tension est d'autant plus importante que la tension initiale est forte. La teinture de Crataegus a peu d'effets sur les sujets normaux et les hypertendus légers.

Remarque

- Des doses plus élevées (6 g/jour) ne donnent pas des résultats beaucoup plus favorables.
- L'action hypotensive persiste une douzaine de jours après arrêt du traitement parfois 20 jours, après quoi elle retourne à son niveau initial.
- Il est parfois intéressant de prolonger le traitement un certain temps.
- Aucun signe d'action cumulative.

Conclusion

"La teinture de Crataegus, dénuée de toute toxicité, possède une action hypotensive non négligeable qui mérite de la faire figurer en bonne place dans l'arsenal thérapeutique de l'Hypertension".

II Etude de l'emploi d'extraits injectables de Crataegus dans les cas d'artérite obliterante des membres inférieurs.
L. di Renzi et coll. - 1968 - Boll. della Societa italiana di cardiologia (52)

But de l'étude

Utilisation d'extraits injectables de Crataegus (cardiplant ®) riches en flavanoïdes dans la thérapie des troubles de la circulation artérielle périphérique et recherche d'un effet vaso-actif.

Méthode

Sont choisis 20 sujets des deux sexes de 42 à 65 ans atteints d'artériopathie à évolution oblitérante des membres inférieurs pendant la phase dite "d'engagement artériolaire" (classification de Condo--relli).

Après la prise de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle, enregistrement rhéographique aux membres inférieurs à l'état de repos puis une marche de longueur variable selon les sujets mais déterminant l'apparition d'une claudication, les patients reçoivent par voie intra-veineuse 2 ampoules d'extrait de Crataegus (= 0,14 g d'extrait au total).

Après une période de récupération les mêmes tests sont répétés.

Paramètres de l'analyse

Comparaison avant et après administration du Crataegus de :

- Fréquence cardiaque
- Pression artérielle
- Aire inscrite sous la courbe rhéographique relative à 1,5 m de tracé et correspondant à une minute d'enregistrement. Sont retenues les variations supérieures ou inférieures à 10 % de la valeur de base.

Résultats

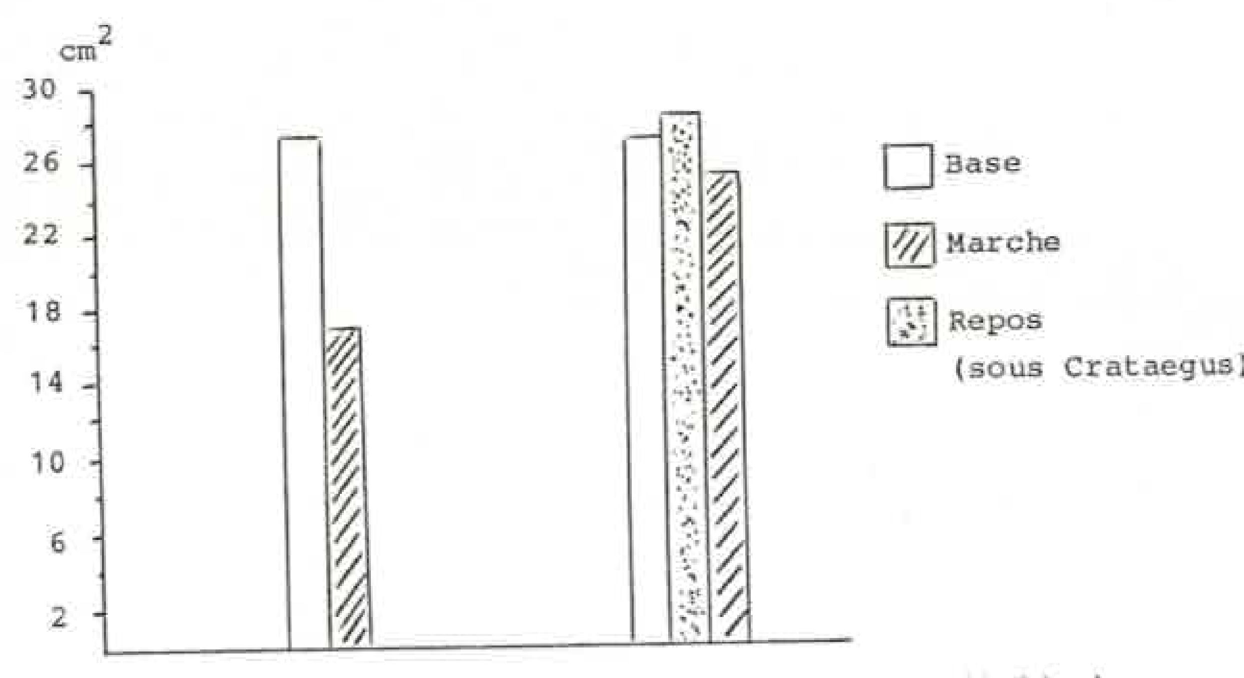
L'administration du Crataegus provoque :

- Sur la fréquence cardiaque : au repos une certaine tendance à la diminution, (de 8 battements/minute)
- Sur la pression artérielle : au repos variations légères. Pour la plupart des cas, la pression systolique baisse de 5 à 10 mm Hg, la pression diastolique de 5 mm Hg.

- Sur le rhéogramme périphérique des membres inférieurs : valeurs moyennes de l'aire inscrite sous l'onde rhéographique de 1,5 m de tracé continu pour 20 sujets traités :

Base Aire cm^2/mn	Après la marche Aire cm^2/mn	Base Aire cm^2/mn	Après I.V. de Crataegus	
			Au repos	Après la marche
27,6	17,2	27,3	28,5	25,2

Surface moyenne de l'aire inscrite sous la courbe rhéographique relative à 1,5 m de tracé continu chez 20 sujets :



Interprétation des résultats

L'administration I.V. de Crataegus provoque de modestes tendances à bradycardie et hypotension.

Mais surtout l'administration de Crataegus détermine au repos une augmentation non constante de l'aire inscrite sur la courbe rhéographique et empêche la réduction de cette aire après exercice musculaire alors que avant traitement cette aire diminue par l'exercice et qu'apparaissent en même temps les troubles de la claudication.

Conclusion

Le Crataegus préserve partiellement de l'ischémie post-contractionnelle une grande partie des sujets traités.

C EFFET SEDATIF DE L'AUBEPINE SUR LE SYSTEME NEURO-VEGETATIF

Cette activité sédative de l'Aubépine a été relevée par plusieurs auteurs lors des traitements suivants : insuffisance cardiaque - Hypertension.

Herfort et Letzer (11) traitant 50 patients pour érétisme cardiaque observent par un traitement à l'Aubépine la normalisation de S - T sur l'E.C.G., la disparition de la stase circulatoire. Ils constatent toujours une activité sédative, disparition des céphalées et des troubles du sommeil.

Dans la revue de Phytothérapie, 1954, Leclerc (39) fait les mêmes observations chez des sujets hypertendus soumis à l'action de la teinture d'Aubépine : les effets de la médication se traduisent par l'abaissement de la pression artérielle, par la sédation de l'érétisme cardio-vasculaire, par la disparition ou diminution de la dyspnée, de l'insomnie, de la céphalée, de l'angoisse et des vertiges.

Selon Brel (Revue de Phytothérapie 1938 - 20), Gilbert Robi "imprègne" d'Aubépine ses jeunes sujets nerveux, agités, coléreux en les soumettant pendant des semaines à un traitement quotidien de 6 cuillerées à café d'extrait par jour. Pour lui, l'extrait d'Aubépine remplace avec bonheur les barbituriques chez les déçus, mélancoliques, surmenés, chaque fois que le système nerveux est hyper-exalté.

Activité de dérivés de Crataegus oxyacantha en dermocosmétique fonctionnelle - Loughi Rocchi et Coll. (Fitoterapia - 1984 - (41).

Evaluation d'un extrait de C. oxyacantha riche en flavonoïdes sur 50 sujets jeunes des 2 sexes, présentant une peau normale ou souffrant d'acné vulgaire ou rosacée. Tous ont eu des applications de liposomes contenant l'extrait de Crataegus pendant au moins 30 jours.

Certains flavonoïdes ont fait preuve d'une activité sur la paroi des capillaires et probablement sur la paroi périvasculaire. C'est la raison pour laquelle il a été décidé de tester l'activité d'un extrait de Crataegus en applications externes dans les cas de perturbations de la microcirculation cutanée.

Le choix des liposomes de phosphatidylcholine comme excipient semble être approprié comme étant le véhicule le plus simple, sachant que les liposomes de phospholipides favorisent grandement la pénétration des principes actifs.

Les résultats ont été statistiquement significatifs sur la seborrhée, l'erythrose l'hydratation du stratum corneum, la rugosité de la peau. Les résultats sont cottes bons dans 73,3 % des cas, moyens dans 19,5 % et nuls dans 4,3 % des cas.

Les résultats thermographiques suggèrent que des facteurs microcirculatoires jouent un rôle dans la genese de l'hypersécrétion sébacée.

Conclusion

- La préparation testée n'a pas d'effets indésirables même appliquee sur des peaux sensibles
- Elle possède un effet antiséborrhéique précoce, sans effet rebond d'hypersécrétion
- Elle possède une activité protectrice des capillaires dûe à l'extrait de Crataegus, se manifestant par la réduction ou disparition de la congestion capillaire responsable d'érythrose
- Elle possède une activité anti-inflammatoire bénefique dans le traitement de l'acné
- Elle augmente la microcirculation sanguine assurant ainsi une meilleure nutrition de la peau, disparition de l'érythème.
  Il s'ensuit une amélioration de l'hydratation et de l'élasticité de la peau.

Son utilisation est donc recommandée dans séborrhée, acné, rougeur, rugosité et pour hydrater le stratum corneum.

C H A P I T R E   V

E T U D E   T O X I C O L O G I Q U E

ETUDE DE LA TOXICITE DES EXTRAITS D'AUBEPINE SUR L'ANIMAL

A) TOXICITE AIGUE

Peu de données ont été publiées et les chiffres sont difficilement comparables en raison de l'hétérogénéité des extraits. Cependant ces extraits sont toujours cités comme peu toxiques.

Etudes realisées à la Faculte de Chimie et Pharmacie de Tübingen - Allemagne - 1981 - (6).

Substance	Animal	Dose et voie	Remarques
Esbericard (32)	Cobaye narcose	15,25 ml/kg IV en continu	Action chronotrope négative sur l'ECG ; mort par arrêt cardiaque
Crataegutt (58)	Cobaye narcosé	2,15 ml/g IV en continu en 20'	Mort par paralysie respi--ratoire, le coeur continu à battre 30' avec une fréquence réduite.
	Cobaye narcosé	4,2 ml/g voie orale	Arrêt respiratoire après 3 h 1/2, le coeur bat 30' a un rythme ralenti.
	Cobaye narcosé sous assistance respiratoire	7,5 ml/g IV en continu	Arrêt du coeur par brady-cardie
Procyanidines dimériques (53)	Souris	160 mg/kg IP	
Phlobaphènes (32)	Cobaye narcosé	15,7 ml/kg IV	
Heptahydroxy-flavonbioside (14)	Lapin	80-100 mg/kg IV	Arrêt cardiaque en diastol
	Cobaye	46,3 mg/kg IV	

Dose létale 50

Substance	Animal	Voie	DL 50
Extrait total alcoo--lique de feuilles 20 % (6)	/	IV IP orale	390 mg/kg 2610 mg/kg > 6 g/kg
Procyanidines dimériques (53)	Souris	IP SC	130 mg/kg > 300 mg/kg
Heptahydroxy-flavonbioside (14)	Souris	IV	175 mg/kg

B) TOXICITE CHRONIQUE (6)

Peu d'études de toxicité chronique ont été faites. Il est fait état d'une étude de l'administration journalière d'une teinture d'Aubépine chez le cobaye. 0,5 ml/100 g conduit à sa mort en 33-46 jours, il n'y a pas de modification de l'ECG mais on trouve des nécroses hépatiques vraisemblablement dues à l'alcool.

Il n'existe pas d'études de cancérogénèse ni de donnée sur la toxicité foetale.

Conclusion (6)

Compte tenu des résultats des études de toxicité aiguë ainsi que de l'utilisation de ces extraits de plantes dans la thérapeutique depuis plus de 100 ans chez de nombreux patients chez lesquels il n'a été mis en évidence ni effet secondaire, ni toxicité, il est admis que la toxicité de l'Aubépine peut être considerée comme très faible.

TOLERANCE ET EFFETS SECONDAIRES

DE L'AUBEPINE CHEZ L'HOMME

Les auteurs s'accordent à reconnaître l'absence de toxicité de l'Aubépine (6).

Pour Leclerc (39) " un précieux avantage de la médication à l'Aubépine est d'être dépourvue de toute toxicité et de ne jamais provoquer d'accumulation dans l'organisme ce qui permet de la prescrire même chez les malades dont la fonction rénale est entravée".

Les fiches de pratique officinale de la Pharmacopée Française (juillet 1979) signalent qu'à doses très élevées, il y aurait cependant risque de dépression respiratoire et cardiaque avec bradycardie (2).

Lors d'expérimentations cliniques, un cas de nausées a également eté signalé (35).

CHAPITRE VI

INDICATIONS THERAPEUTIQUES

ANCIENS USAGES DE L'AUBEPINE (20)

Aux temps préhistoriques, l'Aubepine aurait joué un rôle alimentaire grâce à ses baies. Les Grecs faisaient présider l'Aubepine aux cerémonies nuptiales. L'arbre était également censé proteger de la foudre.

Son utilisation en thérapeutique n'etait pas importante autrefois : Lemery la conseille comme excellent antihémorragique pour son action astringente. Tragus recommande les fleurs d'Aubépine contre la pleurésie, Culbert contre la leucorrhée et des Crescences contre la goutte.

Ce n'est que vers la fin du XVIIeme siècle qu'une action anti-spasmodique est entrevue.

En 1841, on etudie d'abord l'écorce puis les feuilles et les fleurs. En 1846, le Docteur Jennings de Chicago signale son action sur les nerfs modérateurs du coeur, déterminant l'équilibre entre la pression générale du sang et la force des battements ; l'Aubepine lui parait en outre utile au systeme nerveux par son heureuse influence sur le sympathique et sur le plexus solaire. En 1910, son collègue Reilly signale son utilité chez les malades intolérants à la digitale et Clément en fait un remède souverain contre l'angine de poitrine.

En France, on connait l'Aubépine depuis 1909 grâce à Leclerc et Renon qui en 1914 parlent de l'action sédative exercée sur le système nerveux et sur le systeme sympathique du coeur par l'heureuse association de l'Aubepine et de la Thiosamine.
Leclerc utilise l'Aubépine comme toni-cardiaque, comme sédatif neuro-végétatif (angoisse, insomnies, vertiges, éréthisme cardiaque), pour lutter contre l'hypertension.
Elle est inscrite à la Pharmacopee Française depuis 1937 (fleurs).

INDICATIONS ACTUELLES

I DOMAINE CARDIO-VASCULAIRE

Voie orale

- Insuffisance coronarienne légère (45) :
  Forme hypodynamique de l'angine de poitrine (45) (8)
- Certains troubles du rythme (2) (8) (45)
- Traitement d'appoint dans l'insuffisance cardiaque (2), en particulier coeur sénile ou l'emploi de digitaliques n'est pas toujours justifié au début. Une digitalisation precoce peut déterminer un endommagement iatrogène coronaire et cardiaque (45).

Formes d'emploi et posologie (2)

- Infusé (10 g/l infusion de 15 minutes) :
  250 ml 2 à 3 fois par jour
- Teinture : 1 à 5 g/jour
- Extrait fluide : 0,5 à 2 g/jour

II HYPERTENSION ARTERIELLE (29) (63) ATHEROSCLEROSE

Voie orale

Formes d'emploi et posologie (63)

- Teinture alcoolique au 1/5 : 20 gouttes avant chaque repas, 3 semaines par mois.

III SEDATIF NERVEUX ET ANTISPASMODIQUE (2) (29)

Voie orale

- Nervosite, émotivité, anxiéte
- Bouffées congestives de la ménopause (20) (63)

- Insomnies
- Vertiges
- Terreurs nocturnes des enfants

Formes d'utilisation et posologie (43)

- Infusion : 1 cuillère à soupe de fleurs par tasse, 2 à 3 fois par jour
- Alcoolature à 20 % : 20 gouttes avant les 2 repas

IV ASSOCIATIONS USUELLES

1 Associations toni-cardiaques

. Gouttes toni-cardiaques (11)

Teinture d'Adonis Teinture d'Aubepine	aa 10 g

30 gouttes dans un peu d'eau , 3 fois par jour au milieu des repas.

. 1/8 mg Digoxine + 32 mg d'extrait sec de Crataegus (45).

2 Associations antispasmodiques et sédatives (63)

Teinture d'Aubepine	20 g	40 à 60 gouttes 3 fois par jour
Teinture de Passiflore Alcoolature de ballote	aa 10 g	

Teinture de Belladone	1 g	20 gouttes dans un peu d'eau, 2 fois par jour (anxiéte - angoisses)
Teinture de Crataegus Teinture de Passiflore	aa 10 g	

Teinture de Passiflore Teinture de Crataegus	aa 3 g	Une cuillère à café
Teinture de Valériane	4 g	dans un peu d'eau
Hydrolat de Menthe qsp 90 ml		(sédatif cardio-vasculaire).

On l'associe également aux barbituriques et sympatholytiques de synthèse(2).

Nombreuses spécialités (16) : en 1974, 74 spécialités contiennent un extrait de crataegus ; plusieurs sont inscrites au Vidal (13).

. 2 spécialités à base d'extrait pur. Les indications revendiquées sont :

palpitations, éréthisme cardio-vasculaire, hypertension artérielle, algies veineuses, cardialgies, états nerveux de la ménopause, petits états anxieux, insomnies, énurésies, adjuvant ou intercalaire des cures digitaliques

. Les autres sont des formules composées où l'Aubépine est associée avec : barbituriques

Extraits végétaux sédatifs (Passiflore - Balotte)
Papavérine
Substances "vitaminiques P" (flavonoïdes, Marron d'Inde)
Belladone, Jusquiame
Bromures
Quinine, Quinidine
Noix vomique
Gui, Strophantus
Ergotamine.